

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 7 月 31 日 (31.07.2003)

PCT

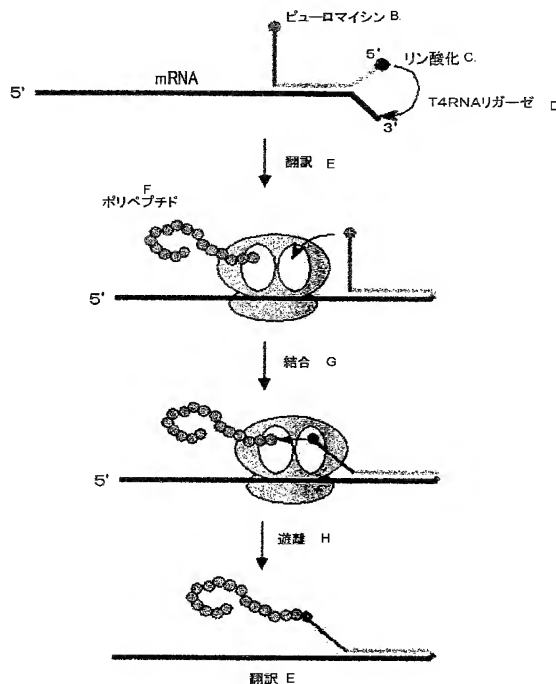
(10) 国際公開番号  
WO 03/062417 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 特願2002-211405 2002 年 7 月 19 日 (19.07.2002) JP  
C07K 14/00, C12P 21/02, C07H 19/16
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/00544
- (22) 国際出願日: 2003 年 1 月 22 日 (22.01.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-12820 2002 年 1 月 22 日 (22.01.2002) JP  
特願2002-31779 2002 年 2 月 8 日 (08.02.2002) JP  
特願2002-44955 2002 年 2 月 21 日 (21.02.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 根本 直人 (NEMOTO, Naoto) [JP/JP]; 〒194-0041 東京都町田市玉川学園4-20-28-201 Tokyo (JP). 佐々木 亨 (SASAKI, Toru) [JP/JP]; 〒194-0041 東京都町田市玉川学園8-19-15 第五秀月荘201 Tokyo (JP). 白鳥 美和 (SHIRATORI, Miwa) [JP/JP]; 〒194-0044 東京都町田市成瀬2-12-3 ポプラヶ丘6号棟306号室 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: RNA-DNA LIGATION PRODUCT AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: RNA-DNA 結合体およびその利用



B...PUROMYCIN  
C...5'-PHOSPHORYLATION  
D...T4 RNA LIGASE  
E...TRANSLATION  
F...POLYPEPTIDE  
G...LIGATION  
H...RELEASE

(57) Abstract: A method of ligating nucleic acids characterized in that a single-stranded RNA and a single-stranded DNA, which have sequences complementary to each other, are annealed and then treated with an RNA ligase; a nucleic acid construct which is bonded to a target mRNA and then translated so as to give a ligation product of the target mRNA to a protein encoded thereby; a method of screening a nucleic acid and/or a protein using a ligation product of a target mRNA and a protein encoded thereby; a puromycin derivative subjected to the final deblocking by an enzyme reaction; a carrier protein useful in functionally expressing a target peptide or a target protein having relatively short amino acid residues (for example, a peptide library made up of random sequences) in a cell-free translation system; and a method of ligating two single-stranded or double-stranded DNAs, which have sequences complementary to each other and are in different types, in the absence of any primers. Thus, it becomes possible to synthesize an *in vitro* virus genome, which can be produced at only a poor efficiency by the conventional methods, within a short period of time at a high efficiency.

[続葉有]



WO 03/062417 A1



(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,

AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明によれば、互いに相補的な配列を有する一本鎖RNAと一本鎖DNAとをアニーリングさせた後にRNAリガーゼで処理することを特徴とする核酸の連結方法; 標的mRNAと結合させた後に翻訳することにより、該標的mRNAとそれがコードするタンパク質との連結体を作製させることができる核酸構築物; 標的mRNAとそれがコードするタンパク質との連結体を用いる核酸および/またはタンパク質の選択方法; 酵素反応で最終脱保護を行なうピューロマイシン誘導体; ランダム配列から成るペプチドライブラリーなどの比較的短いアミノ酸残基を有する目的ペプチドまたは目的タンパク質を無細胞翻訳系において機能的に発現させる際に有用な支持体タンパク質; 並びに、互いに相補的な共通配列を有する異なる2種類の1本鎖または2本鎖DNAをプライマーの非存在下において連結する方法、が提供される。本発明によれば、従来の方法では製造の効率が悪かった in vitro virus genome を短時間に高効率で合成することが可能になる。

## 明細書

## RNA-DNA結合体およびその利用

## 技術分野

本発明は、互いに相補的な配列を有する一本鎖RNAと一本鎖DNAとをアニーリングさせた後にRNAリガーゼで処理することを特徴とする核酸の連結方法並びにその利用に関する。

さらに本発明は、標的mRNAと結合させた後に翻訳することにより、該標的mRNAとそれがコードするタンパク質との連結体を作製させることができる核酸構築物、並びにその利用に関する。

さらに本発明は、標的mRNAとそれがコードするタンパク質との連結体を用いる核酸および／またはタンパク質の選択方法、並びに、タンパク質と被験物質との相互作用の検出方法に関する。

さらに本発明は、酵素反応で最終脱保護を行なうピューロマイシン誘導体および支持体に関する。

さらに本発明は、ランダム配列から成るペプチドライブラリーなどの比較的短いアミノ酸残基を有する目的ペプチドまたは目的タンパク質を無細胞翻訳系において機能的に発現させる際に有用な支持体タンパク質、上記支持体タンパク質を用いてペプチドライブラリーを機能的に発現させる方法、並びに上記支持体タンパク質を用いて機能性ペプチド又はタンパク質をスクリーニングする方法に関する。

さらに本発明は、互いに相補的な共通配列を有する異なる2種類の1本鎖または2本鎖DNAをプライマーの非存在下において連結する方法、並びに上記した核酸の連結方法を用いてペプチドライブラリーなどのペプチド又はタンパク質を発現させる方法に関する。

## 背景技術

(1) 遺伝子工学において核酸の切断および連結は最も重要な基本的手法の一つである。2種類の核酸を連結させる方法としては、従来はライゲーションが主であり、DNAリガーゼを用いたものがほとんどであった。

一方、RNAの連結はT4RNAリガーゼを用いて、主に人工rRNAの合成 (Bruce AG, Uhlenbech OC: Biochemistry, (1982) 21(5) 855-61) や全長cDNA作製のためのmRNAの5'端へのプライマー付加する方法 (Troutt AB, et al.: Proc Natl Acad Sci USA(1992) 89(20): 9823-5) などがある。

最近になって進化分子工学の手法としてmRNAとそれによりコードされたタンパク質を無細胞翻訳系の中で共有結合させる技術 (in vitro virus 法) (Nemoto, N., et al. (1997) FEBS Lett. 414, 405-408) が登場し、そこでmRNAとその3'末端にDNAを連結する必要がでてきた。一般にRNAは一本鎖であるため、繋げようとするDNAとRNAの配列に相補な添え木となるDNAをハイブリダイズさせて、DNAリガーゼで連結する方法が考えられる。しかし、これは効率の面で好ましくなく、in vitro virus 法の利用にあたって大きな課題となっている。

一方、西垣らは一本鎖のDNA同志を連結させるために、それらの一部に相補な配列を持たせ、ハイブリダイズさせることで、濃度効果を高め、T4RNAリガーゼを用いて効率良く一本鎖DNA同志を連結させる方法を考案している(Yーライゲーション法とも称される) (K. Nishigaki, (1998) Molecular Diversity, 4: 187-190)。しかしながら、一本鎖RNAと一本鎖DNAとをYーライゲーション法を用いて連結することは報告されていない。

(2) 1990年に開発されたファージディスプレイ法 (Scott JK & Smith GP, (1990) Science, 249; 386-390) は、様々なタンパク質を大腸菌ファージ表面に提示して特定のターゲット分子に特異的に結合するタンパク質を迅速に見い出すことができる進化分子工学的手法の一つである。ファージディスプレイ法の実用化により、この手法を利用して様々な応用が始まった。また、大腸菌等の細胞表



面の膜タンパク質を利用してこのようなランダムな配列のペプチドを提示し、機能ペプチドを取得する方法も開発された (Lu, Z. et al. (1995) *Bio/Technology* 13: 366-372)。

これらの方法はいずれも機能ペプチドを取得する有効な方法であるが、生細胞を用いるため、提示するペプチド配列に片寄りが生じるなどの問題点も有している。

一方、1997年に開発された *in vitro virus* 法は、無細胞翻訳系中において mRNA とそれによりコードされたタンパク質を mRNA の 3' 末端側にピュロマイシン付スパーサを介して連結させる方法である (Nemoto, N. et al. (1997) *FEBS Lett.* 414, 405-408, Roberts, R. W. et al (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12297-12302)。このようにして作成された mRNA とタンパク質との複合体; 以下これを単に「RNA-タンパク質複合体」と称することがある) では、無細胞翻訳系でタンパク質を発現させるために、生細胞を用いた場合に問題となる配列の片寄りが生じにくく、また、1回でスクリーニングするライブラリーサイズが大きいという利点を有する。しかしながら、下記するような幾つかの問題点も有している。

ファージディスプレイ法又は大腸菌の表面にペプチド等を提示する方法の場合には、培地中からのタンパク質又はペプチドの精製が容易であるが、無細胞翻訳系は細胞を破碎した中からの抽出物であるため、RNA 分解酵素や DNA 分解酵素等のような夾雑物の含有量が極めて多い。また、*in vitro virus* 法で作製される *in vitro virus virion* は、核酸とタンパク質が結合した形態であるが、このうちの核酸部分は遺伝子情報をコードしているため分解されることで大きなダメージを受ける。従って、*in vitro virus* 法では、*in vitro virus virion* を無細胞翻訳系から迅速に分離することが重要な課題である。また、*in vitro virus virion* の mRNA はなるべく早く DNA に転化して分解されにくくすることが望ましい。しかし、無細胞翻訳系の中での逆転写は困難であるため、無細胞翻訳系から *in vitro virus virion* を迅速に分離することが望ましい。

従来の in vitro virus virion の精製技術としては大きく 2 つに分けることができる。一つは、poly A を含む puromycin スペーサを利用して oligo dT で精製する方法 (RW Roberts & JW Szostack (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12297-12302) であり (図 1 の (1) を参照)、もう一つは、遺伝子の両端に FLAG と His×6 タグを連結させておき翻訳後、FLAG 抗体及び Ni-NTA カラムで精製するやり方である (AD Keefe & JW Szostak, (2001) *Nature*, 410, 715-718) (図 1 の (2) を参照)。これらのスペーサによって精製は可能であるが、in vitro virus virion を安定化するために逆転写することが難しい。

そこで、逆転写可能な T 型の puromycin スペーサが提案された (I Tabuchi, et al. (2001) *FEBS lett.* 508(3); 309-312) (図 1 の (3) を参照)。このような T 型の puromycin スペーサを用いることにより、逆転写が可能になり in vitro virus virion を DNA 化して安定化することができる。しかし、この場合、精製に際し、図 1 の (1) の場合のようにスペーサを用いて精製することができない。また、図 1 の (2) の場合のようにタンパク質側で精製することは可能であるが、mRNA にアフィニティタグをコードさせることが必要になる。

(3) アミノアシル tRNA3' 末端部分の構造疑似体としてリボソーム上においてペプチド鎖に結合し翻訳反応を停止するピューロマイシンは、遺伝情報とその翻訳産物を結び付けるための分子ツールとして近年分子進化工学などの分野で注目され始め、実用的な誘導体が数多く合成されるようになっている (Nemoto, N. et al (1997) *FEBS Lett.* 414, 405-408, Roberts, R. W. et al (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12297-12302)。分子進化工学的な応用 (In Vitro Virus 法) に用いられる誘導体には、ピューロマイシン及びそれを mRNA に結合させるための相補 DNA、さらに精製や検出のためのプローブなどが含まれることが必要とされ、それらは一般にオリゴヌクレオチド合成の手法、すなわちホスホアミダイト法によって調製されている。分子進化工学分野以外でのピューロマイシンの応用例としては、タンパクの C 末端を特異的に蛍光プローブなどで修飾する C 末端ラベル法があり

(Nemoto, N., et al (1999) *FEBS Lett.* 462, 43-46)、この場合も用いられるピューロマイシン誘導体の調製にはホスホアミダイト法が使われることが多い。

ピューロマイシンをホスホアミダイト法の 3' - 支持体に導入して用いる場合、通常のヌクレオシドと同様に 5' - 水酸基はジメトキシトリチル (DMT) 基で保護し、2' - 水酸基は通常の 3' - 水酸基の代わりとしてコハク酸を介して担体に結合させ、アミノ酸部分の  $\alpha$  - アミノ基は伸長反応終了後の濃アンモニア水による脱保護で除去できるトリフルオロアセチル (Tfac) 基で保護するのが一般的であると考えられる。実際にこのような形でピューロマイシンを C P G (Controlled Pore Glass) 上に固定した支持体 (ピューロマイシン CPG) がグレンリサーチ社より市販されるようになっており、3' - 末端にピューロマイシンを有するオリゴヌクレオチドを固相合成機上で合成することが一般的に可能になっている。蛍光プローブなども実用的なホスホアミダイトに誘導体化されたものが入手可能であれば合成機上で導入することができ、ある程度の機能が導入されたピューロマイシン誘導体の調製が可能である。

ピューロマイシン C P G の Tfac 基は伸長サイクルにおける反応に耐え、濃アンモニア水処理によりリン酸ジエステルの保護基であるシアノエチル基や塩基部分の保護基などと共に除去されるという点で通常のホスホアミダイト法による DNA 合成に適している。しかし、合成機上でピューロマイシン誘導体を合成した後にさらに修飾などの反応を行なう場合、 $\alpha$  - アミノ基が脱保護された状態で次の反応に進むことは多くの場合困難を伴う。例えば、固相合成後にプローブなどを配列の途中に導入することを考えてオリゴヌクレオチドを合成する時はアミノ修飾 dT (グレンリサーチ) のような特殊ホスホアミダイトを特定の場所にカップリングさせ、合成終了後に活性エステル化されたプローブなどでこのアミノ基を修飾するのが一般的であるが、ピューロマイシンの  $\alpha$  - アミノ基が脱保護されている時はアミノ修飾 dT 部分だけで特異的に修飾反応を行なうことが難しくなる。 $\alpha$  - アミノ基はピューロマイシンの活性に必須の官能基であるためそれが修飾された誘導体には活性を全く期待できないばかりでなく、他のアミノ基のみで修飾された目的物を

分離精製することも誘導体がある程度の大きさを持ったオリゴマーになれば不可能に近くなる。

新たな機能が付加されたピューロマイシン誘導体を容易に調製するための手段を得ることはその応用展開を効率的に進めるためにも重要であると考えられる。用途に合わせて特殊なホスホアミダイトを合成することも1つの手段であるが、合成にコストがかかるだけでなく、ホスホアミダイト法の反応に耐えられない物質は数多くあり、誘導体化も制限を受けることになる。 $\alpha$ -アミノ基の保護基を残した状態でホスホアミダイト法による合成を完了させ、修飾反応を行なった後に副反応を起こさない穏やかな条件で $\alpha$ -アミノ基を脱保護することが可能になれば、市販の試薬などを用いて様々な誘導体化を容易に行なうことが出来るようになるのは確実である。

Tfac 基に代わる新たなピューロマイシン $\alpha$ -アミノ基の保護基には幾つかの条件が求められる。まず Tfac 基と同様にホスホアミダイト法の伸長サイクルにおける各反応に耐えられること、そして Tfac 基と異なり濃アンモニア水処理による脱保護反応で除去されないこと、さらに副反応を起こさない条件で最終的に除去されること、の主に3点である。一般に用いられるアミノ保護基の中でこれらの条件を満たすものは皆無に近く、例えば代表的なアミノ保護基である Boc (t-butoxycarbonyl) 基は、伸長サイクルにおける脱保護において徐々に遊離が進むだけでなく、完全な脱保護をトリフルオロ酢酸溶液中で行なおうとした時に、アデノシンやグアノシンでの脱プリンという深刻な副反応を伴うためホスホアミダイト法による DNA 合成には適さない。実用レベルですべての条件を満たす保護基を得るためには、新規の脱保護法の導入も含めた対応策の検討が必要となる。

(4) 様々な配列のペプチドまたはタンパク質をファージ等のコートタンパク質と融合させてディスプレイ (ファージディスプレイ法) (Scott, J. K. & Smith, G. P., (1990) Science 1990, 249: 386-390) させることにより、目的分子に結合する機能ペプチドをこのファージ集団から取得する方法が開発されている。ま

た、大腸菌等の細胞表面の膜タンパク質を利用してこのようなランダムな配列のペプチドを提示し、機能ペプチドを取得する方法も開発された (Lu, Z. et al. (1995) *Bio/Technology* 13: 366-372)。これらの方法はいずれも機能ペプチドを取得するための有効な方法であるが、生細胞を用いるため提示するペプチド配列に片寄りが生じるなどの問題点も有している。

一方、最近になって無細胞翻訳系中で mRNA とそれにコードされたタンパク質を mRNA の 3' 末端側にピューロマイシン付スペーサを介して連結させる方法が開発された (Nemoto, N. et al. (1997) *FEBS Lett.* 414, 405-408, Roberts, R. W. et al (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12297-12302)。この方法では無細胞翻訳系を用いるため上述のような配列の片寄りが生じることはない。ただし、短いペプチドは無細胞翻訳系では発現しにくく mRNA に比べて小さいため、ランダムなペプチドを提示するための支持体となるタンパク質が必要となる。支持体となるタンパク質はそれ自体がフォールディングしやすく、提示するペプチドとの相互作用が生じにくいことが要求される。また、mRNA 等の核酸や他のタンパク質と相互作用しにくいことが望ましい。現在、このような複数の要求にあったタンパク質を作成することが求められている。フォールディングしやすく Cys を含まない支持体としては、*Staphylococcus aureus* のプロテイン A の一部 B ドメイン B (Moks, T., et al., (1986) *Eur. J. Biochem.* 156, 637-643.) が知られている。しかし、B ドメインは IgG の Fc フラグメントに強く結合するために、例えば抗体のエピトープをスクリーニングする際の支持体としては使用できない。

(5) 従来より遺伝子組み換え等で DNA の連結は最も基本的で重要な技術となっている。一般的に最もよく使われている方法は、2 本鎖 DNA を T4 DNA Ligase (Sgaramella V, & Ehrlich SD (1978) *Eur J Biochem* 86, 531-537) を用いて連結させる方法である。この場合、連結しようとする DNA には用いる制限酵素の認識部位が含まれていないことが必要であり、従ってあらかじめ連結しようとする DNA の 1 次配列は既知の必要がある。

一方、1985年にポリメラーゼ連鎖反応法（PCR法）（Saiki RK, et al., (1985) *Science*, 230, 1350-1354）が報告されたことにより、これを利用したDNA連結法であるOverlap extension PCR法がHortonらによって開発された（Horton RM, et al., (1989) *Gene*, 77, 61-68）。これは連結しようとする2つのDNA断片のうち、片方の3'末端側ともう一方の5'末端側に相補な共通配列を持たせる（overlapさせる）ことで、制限酵素を使わずに連結させることができる点で優れた方法であった。連結されたDNAはその両端から増幅させるためのPCR用プライマーで容易に連結されたDNAを取得できる。これは特定のDNA断片同志を連結する際に極めて有用である。

1990年、様々なタンパク質を大腸菌ファージ表面に提示して特定のターゲット分子に特異的に結合するタンパク質を迅速に見い出す進化分子工学的手法であるファージディスプレイ法（Scott JK & Smith GP, (1990) *Science*, 249; 386-390）が実用化され、様々な応用が始まった。その際、ファージのコートタンパク質のN末端側にDNAレベルでランダムな配列を連結させる必要がある。DNAをファージのゲノムに挿入するためには、ファージゲノムのそのものの長さがPCRするには長いため、Overlap extension PCR法を用いず制限酵素を用いて挿入箇所を切断後、同じ制限酵素サイトを両端にもつDNAを挿入していた。挿入するDNAにランダムな配列がある場合、その中に制限酵素部位があると切断されるため、ライブラリの配列が制限されることになる。

一方、1997年に開発されたin vitro virus法は無細胞翻訳系中でmRNAとそれにコードされたタンパク質をmRNAの3'末端側にピューロマイシン付スペーサを介して連結させる（Nemoto, N. et al. (1997) *FEBS Lett.* 414, 405-408, Roberts, R. W. et al (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12297-12302）。この場合、PCRプロセスと無細胞翻訳系プロセスのみであるためファージディスプレイのように制限酵素を用いた連結法を用いる必要はない。従来のPCR法ではプライマーにより元の1本の鋳型DNAから1万倍以上のDNAが複製する。これは数種類のDNAを連結する場合には問題とならないが、in vitro virus法のように

10の13乗の様々な配列を含むライブラリを必要とする場合には、通常のPCRでは元のライブラリの多様性を著しく損なう。したがって多様性を損なわずにランダムなDNAライブラリを連結し、mRNAを作成する技術が求められている。

上記した通り、*in vitro virus* 法のように *in vitro* で莫大な配列空間をもつライブラリ集団を扱う場合、スクリーニング過程までそのライブラリの多様性を保持させる技術は極めて重要である。

*in vitro virus* 法では1ml当たり10の13乗を超える分子がスクリーニング可能である。これは従来のファージディスプレイ法が1ml当たり10の7乗程度の分子数であることに比べると飛躍的な向上となる。しかし、コピー数が多く含まれるとスクリーニングする実際の分子種が減少する。PCR法で20サイクルの反応をくり返すとそれだけで、理論的には10の6乗のコピー数となり、*in vitro virus* 法でもファージディスプレイ法と同等の多様性しか持たないことになる。

#### 発明の開示

本発明の第一の目的は、一本鎖RNAと一本鎖DNAとを連結するための新規な方法、例えば、*in vitro virus virion* を作製するための鋳型となる構造物（以下、これを *in vitro virus genome* と称することがある）の新規な構築法を提供することである。これに関連して、本発明はまた、短時間に効率よくRNA-DNA結合体を製造する方法を提供することを目的とする。本発明はさらに、上記方法により得られたRNA-DNA結合体を無細胞翻訳系に付してタンパク質とRNAの結合体を効率よく製造する方法を提供することを目的とする。

本発明の第二の目的は、煩雑な操作をすることなく *in vitro virus genome* に親和性物質を付け、*in vitro virion* の精製に有用で、かつ支持体に固定化してプロテインチップ作成する際においても有用な技術を提供することである。

本発明の第三の目的は、煩雑な操作をすることなく *in vitro virus genome* に親和性物質を付け、*in vitro virus virion* の精製に有用で、かつ支持体に固定化してプロテインチップを作成する際においても有用な核酸とタンパク質との複

合体（核酸－タンパク質複合体）を用いる、所望の機能を有するタンパク質の効率的な選択方法等を提供することである。

本発明の第四の目的は、ピューロマイシンの $\alpha$ -アミノ基が酵素的に脱保護されるようにアミノ酸誘導体またはペプチド誘導体で保護した新規ピューロマイシン誘導体を提供することである。

本発明の第五の目的は、比較的短いペプチドを無細胞翻訳系で発現させることを可能とする支持体タンパク質、より具体的には、フォールディングしやすく、提示するペプチドとの相互作用が生じにくい支持体タンパク質、及び mRNA 等の核酸や他のタンパク質と相互作用しにくい支持体タンパク質を提供することである。

本発明の第六の目的は、ランダム配列などの目的配列をコードした DNA 断片のコピー数を増やさずに他の DNA 断片と連結させて、in vitro virus genome に用いるための一本鎖 RNA を作製するための方法を提供することである。

本発明者らは上記した本発明の第一の目的を解決するために鋭意検討した結果、互いに相補的な配列を有する一本鎖 RNA と一本鎖 DNA 又はその誘導体とをアニーリングさせた後に RNA リガーゼで処理することにより、短時間に効率よく RNA－DNA 結合体を製造することができることを見出した。

即ち、本発明によれば、（１）互いに相補的な配列を有する一本鎖 RNA と一本鎖 DNA 又はその誘導体とをアニーリングさせる工程；及び

（２）アニーリング産物を RNA リガーゼで処理して、一本鎖 RNA の 3' 末端と一本鎖 DNA 又はその誘導体の 5' 末端とを連結する工程；

を含む RNA－DNA 結合体の製造方法が提供される。

本発明の好ましい態様によれば、（１）蛋白質をコードするコード配列を含み、3' 末端側に 5' から 3' 方向にアニーリング配列とブランチ配列とを有する一本鎖 RNA と、3' から 5' 方向に上記アニーリング配列と相補的な配列とブランチ配列とを有する一本鎖 DNA 又はその誘導体とをアニーリングする工程；及び



(2) アニール産物をRNAリガーゼで処理して、一本鎖RNAの3'末端と一本鎖DNA又はその誘導体の5'末端とを連結する工程：

を含むRNA-DNA結合体の製造方法が提供される。

好ましくは、一本鎖RNAはmRNA又はmRNAライブラリーである。

好ましくは、一本鎖RNAは、(1) プロモーター配列、(2) 翻訳の際にリボソームによって認識される塩基配列、及び(3) 目的タンパク質をコードする配列を有することを特徴とする。

好ましくは、目的タンパク質は、目的ペプチド又は目的タンパク質と、30から200アミノ酸残基からなる球状タンパク質から成ることを特徴とする目的ペプチド又は目的タンパク質を融合タンパク質として発現及び提示するための支持体タンパク質とから成る融合タンパク質である。

好ましくは、一本鎖DNA又はその誘導体として、3'末端に核酸誘導体が結合している一本鎖DNAの誘導体を使用する。

好ましくは、一本鎖DNA又はその誘導体として、3'末端に核酸誘導体がスパーサーを介して結合している一本鎖DNAの誘導体を使用する。

好ましくは、一本鎖DNA又はその誘導体として、3'末端に、一本鎖RNAの逆転写の際にプライマーとして作用する配列を有する一本鎖DNAの誘導体を使用する。

好ましくは、一本鎖DNA又はその誘導体として、3'末端に、該一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列を有し、かつ核酸誘導体を末端に有するスパーサーが枝分かれした状態で結合している一本鎖DNAの誘導体を使用する。

好ましくは、核酸誘導体は、ピューロマイシン、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド、3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシドの化学構造骨格を含む化合物又はそれらの類縁体である。

好ましくは、スパーサーは、ポリエチレン又はポリエチレングリコールなどの高分子である。

RNAリガーゼは好ましくはT4RNAリガーゼである。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の方法により得られるRNA-DNA結合体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の方法により得られるRNA-DNA結合体を逆転写反応に付してDNA結合体を製造する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の方法により得られるRNA-DNA結合体をタンパク質翻訳系に導入してRNAをタンパク質に翻訳することを特徴とする、RNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成るRNA-タンパク質複合体の製造方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した方法により製造されるRNA-タンパク質複合体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のRNA-タンパク質複合体を逆転写反応に付することを特徴とする、DNAと該DNAによりコードされるタンパク質から成る核酸-タンパク質複合体の製造方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した製造方法により製造される核酸-タンパク質複合体が提供される。

さらに、本発明者らは上記した本発明の第二の目的を解決するために鋭意検討した結果、一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列の3'末端に、該一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列と、核酸誘導体を末端に有するスペーサーとが枝分かれした状態で結合したT字型の構造を有する核酸構築物（以下、T-Spacerとも称する）において、5'末端側に親和性物質と制限酵素認識部位を導入したT-Spacerを用いることにより、一本鎖RNAとそれがコードするタンパク質との複合体を簡単に作製でき、かつ精製できることを見出した。

即ち、本発明によれば、一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列を3'末端側に含み、該一本鎖DNA配列がその3'末端に、該一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列を有し、かつ核酸

誘導体を末端に有するスペーサーが枝分かれした状態で結合しており、該一本鎖DNA配列の5'末端側に親和性物質が結合している、一本鎖RNAとそれがコードするタンパク質との複合体を作製するための核酸構築物が提供される。

好ましくは、該一本鎖DNA配列の5'末端側に制限酵素認識部位が存在する。

本発明の第一の好ましい態様によれば、一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列を3'末端側を含む、一本鎖RNAとそれがコードするタンパク質との複合体を作製するための核酸構築物において、

(1) 該一本鎖DNA配列が、その3'末端に、該一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列を有し、かつ核酸誘導体を末端に有するスペーサーが枝分かれした状態で結合しており、

(2) 該核酸構築物において該一本鎖RNAとアニーリングしない5'末端側は、ループ領域を介して互いに相補的な二本鎖配列を形成しており、

(3) 該ループ領域に親和性物質が結合している、  
ことを特徴とする上記の核酸構築物が提供される。

本発明の第二の好ましい態様によれば、一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列を3'末端側を含む、一本鎖RNAとそれがコードするタンパク質との複合体を作製するための核酸構築物において、

(1) 該一本鎖DNA配列が、その3'末端に、該一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列を有し、かつ核酸誘導体を末端に有するスペーサーが枝分かれした状態で結合しており、

(2) 該核酸構築物において該一本鎖RNAとアニーリングしない5'末端側は、相補DNA鎖と化学的に結合して互いに相補的な二本鎖配列を形成しており、

(3) 該相補DNA鎖の3'末端に親和性物質が結合している、  
ことを特徴とする上記の核酸構築物が提供される。

好ましくは、上記の二本鎖配列中には制限酵素認識部位が存在する。

好ましくは、核酸誘導体は、ピューロマイシン、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド、3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシドの化学構造骨格を含む化合物又はそれらの類縁体である。

好ましくは、スパーサーはポリエチレン又はポリエチレングリコールなどの高分子である。

好ましくは、親和性物質はビオチン又はポリA配列である。

本発明の別の側面によれば、上記した核酸構築物と一本鎖RNAとをアニーリングさせ、該核酸構築物の二本鎖領域の5'末端と一本鎖RNAの3'末端とをライゲーションさせることを含む、RNA-DNA結合体の作製方法が提供される。

好ましくは、ライゲーションはT4RNAリガーゼを用いて行なう。

好ましくは、一本鎖RNAはmRNA又はmRNAライブラリーである。

好ましくは、一本鎖RNAは、(1) プロモーター配列、(2) 翻訳の際にリボソームによって認識される塩基配列、及び(3) 目的タンパク質をコードする配列を有する。

好ましくは、目的タンパク質は、目的ペプチド又は目的タンパク質と、30から200アミノ酸残基からなる球状タンパク質から成ることを特徴とする目的ペプチド又は目的タンパク質を融合タンパク質として発現及び提示するための支持体タンパク質とから成る融合タンパク質である、

本発明のさらに別の側面によれば、上記方法により得られるRNA-DNA結合体、並びに該RNA-DNA結合体を支持体上に固定化したチップが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記方法により得られるRNA-DNA結合体を逆転写反応に付してDNA結合体を製造する方法、上記方法により得られるDNA結合体、並びに該DNA結合体を支持体上に固定化したチップが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記のRNA-DNA結合体をタンパク質

翻訳系に導入してRNAをタンパク質に翻訳することを特徴とする、RNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成るRNA-タンパク質複合体の製造方法が提供される。

好ましくは、翻訳は無細胞翻訳系で行なう。

本発明のさらに別の側面によれば、上記のRNA-DNA結合体をタンパク質翻訳系に導入してRNAをタンパク質に翻訳することにより得られる、RNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成るRNA-タンパク質複合体、並びに該RNA-タンパク質複合体を支持体上に固定化したチップが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記のRNA-タンパク質複合体を逆転写反応に付することを特徴とする、DNAと該DNAによりコードされるタンパク質から成る核酸-タンパク質複合体の製造方法、該製造方法により得られる核酸-タンパク質複合体、並びに、該核酸-タンパク質複合体を支持体上に固定化したチップが提供される。

さらに本発明者らは、上記した本発明の第三の目的を解決するために鋭意検討した結果、一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列の3'末端に、該一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列と、核酸誘導体を末端に有するスペーサーとが枝分かれした状態で結合したT字型の構造を有する核酸構築物（以下、T-Spacerとも称する）において、5'末端側に親和性物質と制限酵素認識部位を導入したT-Spacerを用いることにより、一本鎖RNAとそれがコードするタンパク質との複合体を簡単に構築することができ、さらにこの核酸とタンパク質との複合体を用いることにより効率的に所望の機能を有するタンパク質を選択できることを見出した。

即ち、本発明によれば、（１）上記した本発明によるRNA-DNA結合体を調製する調製工程、（２）調製工程で得られたRNA-DNA結合体をタンパク質翻訳系に導入してRNAをタンパク質に翻訳させてRNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成るRNA-タンパク質複合体を構築する構築工程、

(3) 構築工程で得られたRNA-タンパク質複合体を被験物質との相互作用に基づいて選抜する選抜工程、および、(5) 選抜工程で選択されたRNA-タンパク質複合体の核酸部分を増幅する増幅工程とを含むことを特徴とする核酸および／またはタンパク質の選択方法が提供される。

本発明の好ましい態様によれば、増幅工程で得られた核酸を、一本鎖RNAとしてRNA-DNA結合体を調製する調製工程に供し、(1) 調製工程、(2) 構築工程、(3) 選抜工程、および、(5) 増幅工程を繰り返し行うことを特徴とする上記方法が提供される。

また、本発明の別の態様によれば、(1) (a) 一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列を3'末端側に含む核酸構築物を調製し、(b) 該核酸構築物と一本鎖RNAとをアニーリングさせ、(c) 該アニーリング産物の一本鎖RNAの3'末端と核酸構築物の5'末端とを連結させてRNA-DNA結合体を調製する調製工程、(2) 調製工程で得られたRNA-DNA結合体をタンパク質翻訳系に導入してRNAをタンパク質に翻訳させてRNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成る核酸-タンパク質複合体を構築する構築工程、(3) 構築工程で得られた核酸-タンパク質複合体を被験物質との相互作用に基づいて選抜する選抜工程、(4) 選抜工程で選択された核酸-タンパク質複合体の核酸部分に変異を導入する変異導入工程、および、(5) 変異導入工程で得られた核酸部分を増幅する増幅工程とを含むことを特徴とする核酸および／またはタンパク質の選択方法が提供される。

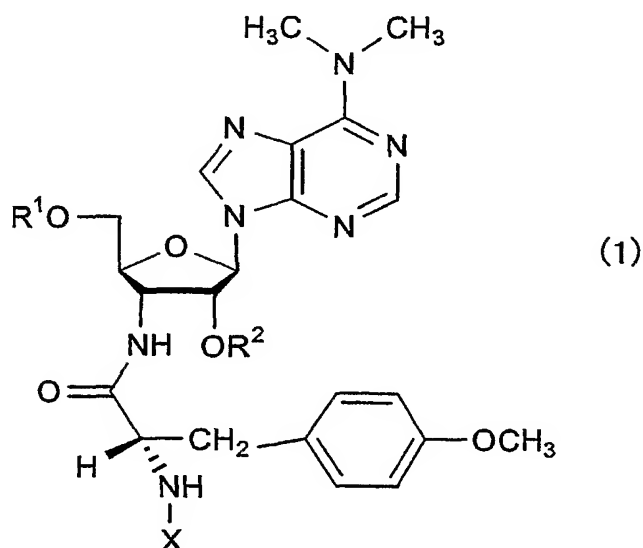
本発明の好ましい態様によれば、増幅工程で得られた核酸を、一本鎖RNAとしてRNA-DNA結合体を調製する調製工程に供し、(1) 調製工程、(2) 構築工程、(3) 選抜工程、(4) 変異導入工程、および、(5) 増幅工程を繰り返し行うことを特徴とする上記方法が提供される。

さらに、本発明の別の態様によれば、(1) (a) 一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列を3'末端側に含む核酸構築物を調製し、(b) 該核酸構築物と一本鎖RNAとをアニーリングさせ、

(c) 該アニーリング産物の一本鎖RNAの3'末端と核酸構築物の5'末端とを連結させてRNA-DNA結合体を調製する調製工程、(2) 該RNA-DNA結合体をタンパク質翻訳系に導入してRNAをタンパク質に翻訳させてRNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成る核酸-タンパク質複合体を構築する構築工程、および、(6) 構築工程で得られた核酸-タンパク質複合体と被験物質との相互作用を調べる検定工程とを含むことを特徴とするタンパク質と被験物質との相互作用の検出方法が提供される。

さらに本発明者らは上記した本発明の第四の目的を解決するために鋭意検討を重ね、ホスホアミダイト法におけるすべての反応に耐え、なおかつ副反応を起こさない穏やかな条件で除去される保護基としてペプチダーゼによって加水分解されるアミノ酸誘導体を考え、幾つかの保護基とペプチダーゼの組合わせを検討した。その結果、Z (benzyloxycarbonyl) 基で保護されたフェニルアラニン (Z-Phe 基) とキモトリプシンの組み合わせが実用的であることを見出した。

即ち、本発明によれば、下記式(1)で表されるピューロマイシン誘導体又はその塩が提供される。



(式中、 $R^1$ は水素原子、又は水酸基の保護基を示し；

$R^2$ は水素原子又は反応性基を示し；

Xはアミノ酸残基あるいはペプチドを示し、Xにおいて、そのカルボキシル基がピューロマイシン中のアミノ基とアミド結合により結合しており、該アミノ酸残基あるいはペプチドの $\alpha$ アミノ基および側鎖の官能基は所望により保護されていてもよい。）

好ましくは、アミノ酸残基あるいはペプチドは芳香族アミノ酸残基である。

好ましくは、該芳香族アミノ酸残基はフェニルアラニン残基である。

特に好ましくは、Xは、 $N\alpha$ -( $N\alpha$ -ベンジルオキシカルボニルフェニルアラニル基である。

好ましくは、 $R^2$ が示す反応性基は、末端にカルボキシル基を有する反応性基である。

特に好ましくは、 $R^2$ が示す反応性基はスクシニル基である。

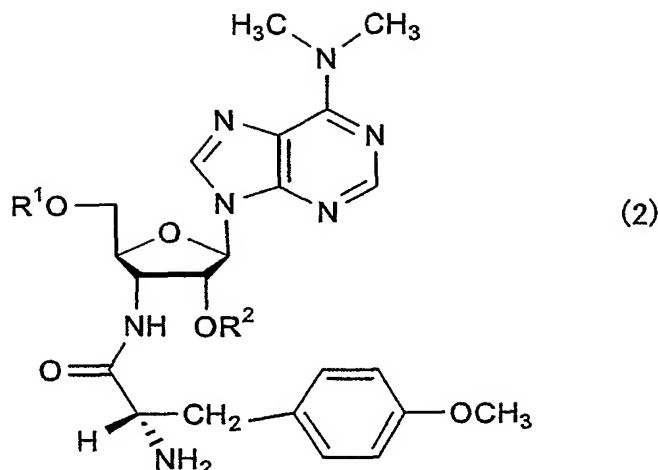
本発明の別の側面によれば、上記のピューロマイシン誘導体を支持体に結合してなる、ピューロマイシン誘導体固定化支持体が提供される。

好ましくは、本発明のピューロマイシン誘導体固定化支持体は、 $R^2$ が示す反応性基と、支持体中の反応性基とを反応させることにより得ることができる。

好ましくは、支持体は、CPG (Controlled Pore Glass) である。

本発明のさらに別の側面によれば、上記のピューロマイシン誘導体をペプチダーゼあるいはプロテアーゼで処理することにより、下記式(2)で表される化合物を製造することを含む、ピューロマイシン誘導体の脱保護方法が提供される。





(式中、 $R^1$ は水素原子、又は水酸基の保護基を示し； $R^2$ は水素原子又は反応性基を示す。)

好ましくは、ペプチダーゼあるいはプロテアーゼはキモトリプシンである。

本発明のさらに別の側面によれば、上記したピューロマイシン誘導体又はピューロマイシン誘導体固定化支持体を用いた核酸化合物の製造方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記したピューロマイシン誘導体を有する核酸化合物が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した核酸化合物をペプチダーゼあるいはプロテアーゼで処理することによりピューロマイシン誘導体の脱保護を行う、脱保護方法が提供される。

好ましくは、ペプチダーゼあるいはプロテアーゼはキモトリプシンである。

さらに本発明者らは上記した本発明の第五の目的を解決するために鋭意検討した結果、支持体タンパク質としては、(1) 球状タンパク質であってフォールディングしやすい、かつ (2) 安定性があるという条件が必要であることを見出し、これらの条件を満たすタンパク質として Oct-1 の Pou-specific domain (73 アミノ酸残基) (Dekker, N. et al. (1993) Nature 362, 852-854) を支持体タンパク質の候補として選択した。そして、このタンパク質中の Cys 残基を Ala 残基に置

換した変異体タンパク質を作成し、このタンパク質を支持体としてペプチドライブラリーを無細胞翻訳系で発現させた結果、機能性ペプチドを効率よく発現できることを見出した。

即ち、本発明によれば、30から200アミノ酸残基からなる球状タンパク質から成ることを特徴とする、目的ペプチド又は目的タンパク質を融合タンパク質として発現及び提示するための支持体タンパク質が提供される。

上記した本発明の支持体タンパク質のなかでも好ましい態様によれば、システイン残基を含まない支持体タンパク質；タンパク質の二次構造として $\beta$ シート構造を有さず、 $\alpha$ ヘリックス構造からなる支持体タンパク質；タンパク質の立体構造において、N末端とC末端が離れている支持体タンパク質；及び、他の生体高分子と相互作用しない支持体タンパク質が提供される。

本発明の特に好ましい態様によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する、目的ペプチド又は目的タンパク質を融合タンパク質として提示するための支持体タンパク質が提供される。

(1) 配列番号21に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列番号21に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、付加および／または挿入しているアミノ酸配列であって、球状タンパク質を構成するアミノ酸配列；

本発明の別の側面によれば、目的ペプチド又は目的タンパク質をコードする塩基配列および上記した何れかの支持体タンパク質をコードする塩基配列が直接またはリンカーを介して連結してなる、目的ペプチド又は目的タンパク質と支持体タンパク質とから成る融合タンパク質をコードする核酸またはその修飾体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、目的ペプチド又は目的タンパク質と上記した何れかの支持体タンパク質とから成る融合タンパク質が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した核酸またはその修飾体を、無細胞翻訳系または生細胞において発現させる工程を含む、融合タンパク質を製造する

方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、目的ペプチド又は目的タンパク質をコードする塩基配列および上記した何れかの支持体タンパク質をコードする塩基配列が直接またはリンカーを介して連結してなる目的ペプチド又は目的タンパク質と支持体タンパク質とから成る融合タンパク質をコードするmRNAであって、その3'末端に核酸誘導体が結合しているmRNAを、無細胞翻訳系または生細胞において発現させる工程を含む、融合タンパク質とそれをコードする核酸とから成る複合体を製造する方法が提供される。

好ましくは、核酸誘導体は、ピューロマイシン、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド、3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシドの化学構造骨格を含む化合物又はそれらの類縁体である。

好ましくは、融合タンパク質をコードするmRNAとして、3'末端に核酸誘導体がスパーサーを介して結合しているmRNAを使用する。

好ましくは、スパーサーはポリエチレン又はポリエチレングリコールなどの高分子である。

本発明のさらに別の側面によれば、(1) 無細胞翻訳系または生細胞において、目的ペプチド又は目的タンパク質を含むライブラリーを、上記した何れかの方法により、本発明の支持体タンパク質との融合タンパク質の形態で発現させる工程；及び、

(2) 工程(1)で得られた融合タンパク質をスクリーニングすることにより所望の機能を有する目的ペプチド又は目的タンパク質を選択する工程；を含む、機能性ペプチド又はタンパク質のスクリーニング方法が提供される。

さらに本発明者らは上記した本発明の第六の目的を解決するために鋭意検討を行い、先ず、互いに相補的な共通配列を有する異なる2種類の1本鎖または2本鎖DNAを連結するためにPCRを行う際に、プライマーを用いずにPCR反応を行った。この場合、連結した全長2本鎖DNAの他に、連結されなかったD

RNAの相補鎖がそのまま残ることになる。通常、このような余分なDNAは精製すべきであるが100塩基以上あるためプライマー除去用の簡易カラムを使うことができず、電気泳動後ゲルから切り出す必要がある。これは作業上効率が悪く収率が低下することが分かっている。

そこで、この問題を回避するために、T7 RNAポリメラーゼ等のウイルス由来のRNAポリメラーゼはプロモータ特異性が高く、2本鎖DNAを特異的に認識するという性質を有することを利用して、一切の精製作業をせずにRNAが合成されるかどうか調べた。その結果、所期の目的どおりのRNAが合成されることがわかった。また、同時に混在するDNAはDNA分解酵素を用いて分解後、精製することで容易に除去できることもわかった。

即ち、本発明によれば、互いに相補的な共通配列を有する異なる2種類以上の1本鎖または2本鎖DNAをプライマーの非存在下においてDNA合成酵素を用いて反応させる工程、上記工程で得た混合物を用いてRNAポリメラーゼの存在下で転写反応を行いRNAを合成する工程、およびDNA分解酵素でDNAを分解する工程を含む、上記した本発明の方法に用いるための一本鎖RNAの製造方法が提供される。

好ましくは、DNA合成酵素を用いた反応は、Taqポリメラーゼを用いるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。

好ましくは、異なる2種類以上の1本鎖または2本鎖DNAのうちの片方のDNAは目的配列を含むDNAである。より好ましくは、異なる2種類以上の1本鎖または2本鎖DNAのうちの片方のDNAは目的配列を含むDNAであり、他方のDNAが転写、翻訳のための配列、タグをコードする配列、あるいは支持体タンパク質をコードする配列のようなコンスタントな配列（コンスタント配列）である。

好ましくは、支持体タンパク質が、30から200アミノ酸残基からなる球状タンパク質から成るタンパク質である。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した方法により得られるRNAが提供

される。

本発明のさらに別の側面によれば、(1)互いに相補的な共通配列を有する異なる2種類の1本鎖または2本鎖DNAをプライマーの非存在下においてDNA合成酵素を用いて反応させることにより、連結したDNAと連結しないDNAを含む混合物を調製する工程；

(2) 工程(1)で得た混合物を用いてRNAポリメラーゼの存在下で転写反応を行いRNAを合成する工程；及び

(3) 工程(2)で得たRNAを、無細胞翻訳系または生細胞において発現させる工程を含む、タンパク質の製造方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、(1)互いに相補的な共通配列を有する異なる2種類の1本鎖または2本鎖DNAをプライマーの非存在下においてDNA合成酵素を用いて反応させることにより、連結したDNAと連結しないDNAを含む混合物を調製する工程；

(2) 工程(1)で得た混合物を用いてRNAポリメラーゼの存在下で転写反応を行いRNAを合成する工程；

(3) 工程(2)で得たRNAの3'末端を核酸誘導体で修飾する工程；及び

(4) 工程(3)で得た3'末端を核酸誘導体で修飾したRNAを、無細胞翻訳系または生細胞において発現させる工程を含む、タンパク質とそれをコードする核酸との複合体の製造方法が提供される。

好ましくは、核酸誘導体は、ピューロマイシン、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド、3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシドの化学構造骨格を含む化合物又はそれらの類縁体である。

好ましくは、mRNAとして、3'末端に核酸誘導体がスペーサーを介して結合しているmRNAを使用する。

好ましくは、スペーサーはポリエチレン又はポリエチレングリコールなどの高分子である。

## 図面の簡単な説明

図 1 は、従来の *in vitro* virus virion の精製技術の具体例を示す。

図 2 は、本発明による Y-ライゲーシヨン法を用いた *in vitro* virus のゲノム構築の模式図である。

図 3 は、本発明で使用可能な核酸構築物の構造を示す。

図 4 は、本発明で使用可能な核酸構築物の具体例を示す。

図 5 は、ライゲーシヨン前の mRNA、及び RT-thio とのライゲーシヨン後の mRNA を電気泳動した結果を示す図である。

図 6 は、ライゲーシヨン後の mRNA の逆転写産物（レーン 3）、及びそれを RNase H で処理した産物（レーン 2）を電気泳動した結果を示す図である。

図 7 は、ライゲーシヨン前の mRNA、及び Hybri spacer とのライゲーシヨン後の mRNA を電気泳動した結果を示す図である。

図 8 は、ライゲーシヨン産物を無細胞翻訳系に添加して得られる翻訳産物を 15% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した結果を示す図である。

図 9 は、mRNA と本発明の T-Spacer (T-splint3FA) とのライゲーシヨンの結果を示す図である。

図 10 は、本発明の T-Spacer を含む *in vitro* virus genome を用いて *in vitro* virus virion を形成した結果を示す。

図 11 は、本発明の T-Spacer を含む *in vitro* virus genome を逆転写した結果を示す。

図 12 は、本発明の T-Spacer を含む *in vitro* virus genome を用いて作製した *in vitro* virus virion を逆転写した結果を示す。

図 13 は、T-spacer（親和性物質としてビオチンを使用）を用いて *in vitro* virus を精製した結果を示す。

図 14 は、T-spacer（親和性物質として Poly A を使用）を用いて *in vitro* virus を精製した結果を示す。

図 15 は、本発明の方法に従い Pool（ネガティブコントロール/POU）から

protein A の B ドメインを選択した結果を示す。

図 1 6 は、本発明の方法に従い Pool (ネガティブコントロール/POU) から protein A の B ドメインを選択した結果を示す。

図 1 7 は、実施例 4 で合成した ZF-puromycin CPG を用いたスパーサーを電気泳動した結果を示す。

図 1 8 は、本発明の概要の模式図を示す。

図 1 9 は、本発明の一実施例として糖鎖結合ペプチドのスクリーニングの模式図を示す。

図 2 0 は、DNA "T7-Kozac"、DNA "Lec-random" 及び支持体のコンスタントな配列を持つ DNA "Pou" の構築を示す。

図 2 1 は、連結産物 "T' 7-Lec-random" を 8 M 尿素変性アクリルアミド電気泳動で解析した結果を示す。

図 2 2 は、連結産物 "T' 7-Lec-random-Pou" を 8 M 尿素変性アクリルアミド電気泳動で解析した結果を示す。

図 2 3 は、T' 7-Lec-random-Pou の転写産物を 8 M 尿素変性アクリルアミド電気泳動で解析した結果を示す。

図 2 4 は、糖鎖ペプチドのスクリーニングの結果を示す。

図 2 5 は、糖鎖ペプチドのスクリーニングの結果として取得された配列をシーケンスした結果を示す。括弧は水素結合できるアミノ酸を示す。選択前より選択後の方が、水素結合可能なアミノ酸を多く含む配列が選択されてきている。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。

#### (I) RNA-DNA 結合体の製造方法およびその利用

本発明による RNA-DNA 結合体の製造方法は、

(1) 互いに相補的な配列を有する一本鎖 RNA と一本鎖 DNA 又はその誘導体

とをアニーリングさせる工程；及び

(2) アニーリング産物をRNAリガーゼで処理して、一本鎖RNAの3'末端と一本鎖DNA又はその誘導体の5'末端とを連結する工程；

を含むことを特徴とする。

本発明の方法では、結合すべき一本鎖RNAと一本鎖DNA（又はその誘導体）は互いに相補的な配列を有することが必要である。互いに相補的な配列を有する一本鎖RNAと一本鎖DNAとを好適な条件下でアニーリングすることにより両者を会合させ、次いで、RNAリガーゼで処理することにより両者を効率よく連結することができる。

本発明の方法は、Y-ライゲーション法でDNA同志を連結させる方法を発展させたものである。本発明では、連結すべき核酸の片方をRNAにすることによって得られたRNA-DNA結合体を新しい用途に用いることにより、効率の良い新規の *in vitro* virus genome (Nemoto, N., et, al. (1997) FEBS Lett. 414, 405-408. ) の構築法を提供することが可能になる。

本発明の方法では、Y-ライゲーション法によりRNAの3'末端と、そのRNA中の配列と相補的な配列を有するDNAの5'末端とをRNAリガーゼで共有結合させる。本発明の方法で用いるRNAは一本鎖RNAであり、より具体的には、蛋白質をコードするコード配列を含むRNAであることが好ましく、また3'末端側に5'から3'方向にアニーリング配列とブランチ配列とを有することが好ましい。

本明細書で言うブランチ配列とは、一本鎖RNA及び一本鎖DNA又はその誘導体中のアニーリング配列同士がアニーリングした際に互いにアニーリングせず、一本鎖の状態で存在する配列である。一本鎖RNA及び一本鎖DNA又はその誘導体中におけるブランチ配列の長さは、両者をRNAリガーゼ処理により連結できる程度の長さであれば特に限定されない。一般にブランチ配列の長さは短い方が連結効率は高いが、上限は特に制限されない。ブランチ配列の長さは、好ましくは1から100塩基、より好ましくは1から10塩基程度である。両核酸中の



ブランチ配列の長さは同一でも異なってもよい。

本明細書で言うアニーリング配列とは、結合すべきDNAとアニーリングすることができる配列であり、一本鎖RNA中のアニーリング配列に相補的な配列が、結合すべき一本鎖DNA中に存在することになる。アニーリング配列の長さは、両鎖がハイブリダイズすることができるのに十分な長さであれば特に限定されないが、一般的には10から50塩基、より好ましくは10から30塩基程度である。

本発明の方法で結合される一本鎖RNAと一本鎖DNA又はその誘導体は互いに相補的な配列を有することにより、両者は一定の条件下でアニーリングすることが可能になる。より詳細には、一本鎖RNA中のアニーリング配列と、一本鎖DNA又はその誘導体中の上記アニーリング配列と相補的な配列とがハイブリダイズすることにより両配列は二本鎖を形成する。その際、一本鎖RNA中のブランチ配列と一本鎖DNA又はその誘導体中のブランチ配列は一本鎖のまま存在するため、これらの部分は全体としてはY字の形を形成することになる（図2の一番上の図を参照）。Yーライゲーション法という名称はこの構造体の形に由来する。この方法の特徴は2種の核酸を連結する反応を分子間反応から分子内反応としたことにより連結効率を向上させることができる点にある。従って、低濃度の基質についても応用することが可能である。

本発明の方法では先ず、上記した互いに相補的な配列を有する一本鎖RNAと一本鎖DNA又はその誘導体（以下、これらをまとめて「一本鎖核酸」と称することがある）とをアニーリングさせる。

アニーリングは上記した2種の本鎖核酸を適当な緩衝液（以後の操作の便宜上から言うと、RNAリガーゼ用の緩衝液が好ましい）に溶解し、高温から段階的に低温にすることにより行なうことができる。このような温度変化はPCR装置などを用いて行なうこともできる。アニーリング条件の一例としては、94℃から25℃まで10分かけて冷却するという条件が挙げられるが、これは一例にすぎず、温度および時間は適宜変更することができる。アニーリングの条件（緩

衝液の組成、アニーリング温度、及びアニーリング時間など）は、アニーリング配列の長さや塩基組成などに応じて適宜設定することができる。

アニーリング反応における一本鎖RNAと一本鎖DNA又はその誘導体のモル比はアニーリング反応が進行する限り、特に限定されないが、反応効率の観点からは、1 : 1 ~ 1 : 2.5程度であることが好ましい。

一本鎖RNAと一本鎖DNA又はその誘導体とのアニーリング後、アニーリング産物はRNAリガーゼで処理して、一本鎖RNAの3'末端と一本鎖DNA又はその誘導体の5'末端とが連結される。

本発明で用いるRNAリガーゼは2つの一本鎖核酸同士を連結できるものであればよく、好ましくはT4 RNAリガーゼを使用できる。

なお、アニーリングの際の溶液としてRNAリガーゼの緩衝液として適当なものを使用した場合には、アニーリング生成物を含む溶液をそのままリガーゼ反応に使用することができ、そうでない場合には、アニーリング生成物を通常の核酸精製方法により回収した後、RNAリガーゼ用の緩衝液に溶解してリガーゼ反応用の溶液を調製する。

連結反応（リガーゼ反応）の条件は、使用するRNAリガーゼの活性が発揮される条件であればよく、例えば、好適な緩衝液（例えば、T4 RNA ligase buffer (50mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 1mM ATP) など）中で、25℃の温度一定で反応させたり、あるいは25℃で30分間と45℃で2分間のサイクルを反復した後に25℃で30分間反応させたりすることができる。ここに示した温度及び反応時間は一例に過ぎず反応効率が高くなるように適宜設定変更することができる。

反応後にフェノール抽出及びエタノール沈殿などの常法により反応生成物を精製することにより、RNA-DNA結合体を得ることができる。このようにして得られるRNA-DNA結合体自体も本発明の範囲内である。

本発明で用いる一本鎖RNAの種類は特に限定されず、天然の組織又は細胞由来のRNAでも、DNAからインビトロで発現させたRNAでもよい。

また、一本鎖RNAの構成要素である核酸の全てがリボヌクレオチドである必要はなく、その一部のみがRNAタイプであるものでもよく、それ以外の領域は、リボヌクレオチド誘導体でもデオキシリボヌクレオチドタイプでもPNAタイプでもよい。また、ペプチドでも糖などが結合したものでもよい。

本発明で用いる一本鎖RNAの長さは、連結反応が可能である限り、特に限定されない。一般的には、一本鎖RNAの長さは、数十塩基から数十キロ塩基程度であり、例えば10塩基から50,000塩基程度であり、より好ましくは20塩基から10,000塩基程度である。

本発明で用いる一本鎖RNAは、蛋白質をコードする配列を含むことが好ましく、具体的にはmRNA又はmRNAライブラリーであることが好ましい。

本発明の方法で得られるRNA-DNA連結体をタンパク質翻訳系に導入するような場合には、連結すべき一本鎖RNAは、(1)プロモーター配列、(2)翻訳の際にリボソームによって認識される塩基配列、及び(3)目的タンパク質をコードする配列が含まれていることが好ましい。さらに、FLAG、Hisタグ等のタグ配列をコードする配列あるいはPCRにより増幅するための共通配列を含むことができる。

プロモーター配列の種類は、適用する発現系に適したものを適宜選択すればよく特に限定されない。例えば、大腸菌ウイルスT7のRNA polymeraseによって認識されるT7プロモーター配列あるいはSP6プロモーター配列などが挙げられる。

翻訳の際にリボソームによって認識されるDNA配列としては、翻訳の際に真核細胞のリボソームによって認識されるRNA配列(Kozak配列)に対応するDNA配列や原核細胞のリボソームによって認識されるシャイン・ダルガノ配列(Shine-Dalgarno)、オメガ配列等のtabacco mosaic virusのリボソームによって認識される配列、rabbit  $\beta$ -globin、Xenopus  $\beta$ -globin あるいは bromo mosaic virus のリボソーム認識領域などが挙げられる。

目的タンパク質をコードする配列の種類は特に限定されず、目的に応じて適宜

選択できる。

本発明で用いる一本鎖DNA又はその誘導体としては、天然由来のDNAから作成した一本鎖DNAでもよいし、遺伝子組換え技術により作成した一本鎖DNAでもよいし、化学合成により作成した一本鎖DNAでもよい。

また、一本鎖DNAの構成要素である核酸の全てがデオキシリボヌクレオチドである必要はなく、その一部のみがDNAタイプであるものでもよく、それ以外の領域は、リボヌクレオチドでもデオキシリボヌクレオチドでもPNAタイプでもよい。また、ペプチドでも糖などが結合したものでもよい。

本発明で用いる一本鎖DNA又はその誘導体の長さは、連結反応が可能である限り、特に限定されない。一般的には、一本鎖DNAの長さは、数塩基から数百塩基程度であり、例えば10塩基から500塩基程度であり、より好ましくは20塩基から200塩基程度である。

本発明の方法では、一本鎖DNA又はその誘導体として、3'末端に核酸誘導体が結合している一本鎖DNAの誘導体を使用することが好ましい。

このような一本鎖DNAの誘導体を使用して無細胞タンパク質翻訳系又は生細胞中でタンパク質の翻訳を行った場合、2本鎖でリボソームを止め、ピューロマイシンがリボソームのAサイトに入れることによりタンパク質と結合させることができる(図2を参照)。

この核酸誘導体としては、無細胞タンパク質翻訳系又は生細胞中でタンパク質の翻訳が行われた時に、合成されたタンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物である限り限定されないが、その3'末端がアミノアシル tRNA に化学構造骨格が類似しているものを選択することができる。代表的な化合物として、アミド結合を有するピューロマイシン (Puromycin)、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド (3'-N-Aminoacylpuromycin aminonucleoside、PANS-アミノ酸)、たとえば、アミノ酸部がグリシンの PANS-Gly、アミノ酸部がバリンの PANS-Val、アミノ酸部がアラニンの PANS-Ala、その他、アミノ酸部が全ての各アミノ酸に対応する PANS-アミノ酸化合物が挙げられる。

また、3'-アミノアデノシンのアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基が脱水縮合して形成されるアミド結合で連結した3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド (3'-Aminoacyladenose aminonucleoside, AANS-アミノ酸)、たとえば、アミノ酸部がグリシンの AANS-Gly、アミノ酸部がバリンの AANS-Val、アミノ酸部がアラニンの AANS-Ala、その他、アミノ酸部が全アミノ酸の各アミノ酸に対応する AANS-アミノ酸化合物を使用できる。

また、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドとアミノ酸のエステル結合したものなども使用できる。さらにまた、核酸あるいは核酸に類似した化学構造骨格及び塩基を有する物質と、アミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質とを化学的に結合した化合物は、すべて本方法において用いられる核酸誘導体に含まれる。

核酸誘導体としては、ピューロマイシン、PANS-アミノ酸もしくはAANS-アミノ酸がリン酸基を介してヌクレオシドと結合している化合物がより好ましい。これらの化合物の中でピューロマイシン、リボシチジルピューロマイシン、デオキシシチジルピューロマイシン、デオキシウリジルピューロマイシンなどのピューロマイシン誘導体が特に好ましい。

本発明の方法では、一本鎖DNA又はその誘導体として、3'末端に核酸誘導体がスパーサーを介して結合している一本鎖DNA又はその誘導体を使用することが好ましい。

スパーサーとしては、ポリエチレン又はポリエチレングリコールあるいはその誘導体などの高分子物質や、オリゴヌクレオチドやペプチドあるいはその誘導体などの生体高分子物質等が用いられ、好ましくはポリエチレングリコールが用いられる。スパーサーの長さは特に限定されないが、好ましくは、分子量150～6000であるか、または主鎖の原子数は10原子から400原子であり、さらに好ましくは、分子量600～3000であるか、または主鎖の原子数が40原子から200原子である。スパーサーには、デオキシリボヌクレオチドなどの核酸およびその誘導体、フルオレセイン等の蛍光色素およびその誘導体、ビオチン等の親和性物質およびその誘導体、あるいは生化学または化学反応により切断さ

れる結合を持つ物質、例えば、5-置換-2-ニトロアセトフェノン誘導体などの光分解性物質等を含むことができる。

上記したような一本鎖DNAの誘導体は、それ自体既知の化学結合方法によって製造することができる。具体的には、リン酸ジエステル結合で合成ユニットを結合させる場合は、DNA合成機に一般的に用いられているホスホアミダイド法などにより固相合成で合成することが可能である。ペプチド結合を導入する場合は、活性エステル法などにより合成ユニットを結合させるが、DNAとの複合体を合成する場合は、両方の合成法に対応が可能な保護基が必要になる。

本発明の方法で得られるRNA-DNA連結体は、これをタンパク質翻訳系に導入してタンパク質に翻訳することによりRNA-タンパク質複合体が形成されるが、この中にはRNAが含まれ、これを逆転写反応に付することによりRNAに相補的なDNA配列を含む結合体を製造することが可能である。

即ち、上記したRNAとDNAとのY-ライゲーション法による連結反応後に、該連結体をタンパク質翻訳系に導入してRNAをタンパク質に翻訳し、さらにその後逆転写酵素を用いて反応させるとRNAからDNAへの転写反応によりRNA-DNA-タンパク質連結体を製造することができる。このような逆転写反応を意図する場合、一本鎖DNA又はその誘導体の3'末端に、一本鎖RNAの逆転写の際にプライマーとして作用する配列を存在せしめておくことが好ましい。このようなプライマー配列を存在させておくことにより、プライマーを新たに添加することなく逆転写反応を行なうことができる。

本発明の好ましい態様によれば、一本鎖DNAの誘導体として、一本鎖RNAの3'末端側の配列に相補的な一本鎖DNA配列を含み、該DNA配列の3'末端に、該一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列を有し、さらに核酸誘導体を末端に有するスペーサーが枝分かれした状態で該一本鎖DNA配列のいずれかに結合している核酸構築物を使用することができる。なお、このような核酸構築物はT字型の構造を有するため、本明細書においては、T-Spacerとも称する。このようなT-Spacerの具体例を図4に示す。

なお、本明細書で言う「一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列」とは、核酸構築物（T-Spacer）と一本鎖RNAとのライゲーションにより得られる本発明の核酸構築物を逆転写反応系に導入した場合に、逆転写反応を開始するためのプライマー配列として作用する塩基配列を意味し、一般的には、一本鎖RNAの配列と相補的な配列から構成されることが好ましい。

さらに、本発明によれば、本発明の方法で得られるRNA-DNA結合体をタンパク質翻訳系に導入して一本鎖RNAをタンパク質に翻訳することを特徴とする、RNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成るRNA-タンパク質複合体の製造方法、並びに当該製造方法により製造されるRNA-タンパク質複合体が提供される。

核酸からそれがコードするタンパク質を人工的に生成させるための転写翻訳系は当業者に公知である。具体的には、適当な細胞よりタンパク質合成能を有する成分を抽出し、その抽出液を用いて目的の蛋白質を合成させる無細胞蛋白質合成系が挙げられる。このような無細胞蛋白質合成系には、リボゾーム、開始因子、伸長因子及びtRNA等の転写・翻訳系に必要な要素が含まれている。

このような無細胞蛋白質合成系（細胞溶解物由来の系）としては、原核又は真核生物の抽出物により構成される無細胞翻訳系が挙げられ、例えば大腸菌、ウサギ網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液などが使用できるが、DNA又はRNAから目的とする蛋白質を産生するものであればいずれでもよい。また、無細胞翻訳系はキットとして市販されているものを使用することができ、例えば、ウサギ網状赤血球抽出液（Rabbit Reticulocyte Lysate Systems, Nuclease Treated, Promega）や小麦胚芽抽出液（PROTEIOS, TOYOBO; Wheat Germ Extract, Promega）などが挙げられる。

タンパク質翻訳系としては、生細胞を使用してもよく、具体的には、原核又は真核生物、例えば大腸菌の細胞などが使用できる。

無細胞翻訳系又は生細胞などは、その中にタンパク質をコードする核酸を添加又は導入することによってタンパク質合成が行われるものである限り制限されな

い。

本発明では、RNA-DNA連結体を上記したようなタンパク質翻訳系に導入して一本鎖RNAをタンパク質に翻訳した後、リボゾームを除去することによって、RNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成るRNA-タンパク質複合体を製造することができる。

さらに本発明によれば、上記で得られるRNA-タンパク質複合体を逆転写反応に付することを特徴とする、DNAと該DNAによりコードされるタンパク質から成る核酸-タンパク質複合体の製造方法、並びに当該製造方法により製造される核酸-タンパク質複合体が提供される。

即ち、RNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成るRNA-タンパク質複合体を逆転写酵素で処理することにより、RNAからDNAへの逆転写が起こり、DNAと該DNAによりコードされるタンパク質から成るRNA-DNA-タンパク質複合体が製造されることになる。さらに得られたRNA-DNA-タンパク質複合体のRNAをRNA分解酵素などを用いて分解することによればDNA-タンパク質複合体が製造される。本明細書では、上記RNA-DNA-タンパク質複合体およびDNA-タンパク質複合体をあわせて「核酸-タンパク質複合体」と称することがある。

上記のようにして得られる、RNA-タンパク質複合体及び核酸-タンパク質複合体は、核酸の機能の解析などにおいて有用な材料を提供するものである。

## (I I) 核酸構築物およびその利用

### (1) 本発明の核酸構築物

本発明の核酸構築物は、一本鎖RNAとそれがコードするタンパク質との複合体又は核酸-タンパク質複合体を作製するために使用するものであり、その構造は、一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列を3'末端側に含み、該一本鎖DNA配列の3'末端に、該一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列を有し、さらに核酸誘導体を末端に有するス



ペーサーが該一本鎖DNAのいずれかに枝分かれした状態で結合しており、該一本鎖DNA配列の5'末端側に親和性物質が結合していることを特徴とする。親和性物質は、RNA-タンパク質複合体又は核酸-タンパク質複合体を固相に結合させるためや、精製を行なうために用いられる。

本発明の核酸構築物の一例の模式図を図3に示す。図3に示す核酸構築物は、固定化したRNA-タンパク質複合体又は核酸-タンパク質複合体（以下、これらを「in vitro virus virion」と称することがある。）を親和性物質を介して結合している固相（支持体）上から切り離すための制限酵素認識部位をもつ二本鎖DNAと、親和性物質としてビオチンまたはpoly Aを有している。なお、図3は、該核酸構築物に一本鎖RNA（mRNA）をアニーリングさせた状態を示している。

親和性物質をin vitro virus virionの精製に用いる例としては、親和性物質としてpolyAを用いる場合、dTカラムによって精製する方法や、親和性物質としてHis-tagを用いる場合はNiを用いて精製する方法、並びに親和性物質としてFLAGペプチドを用いる場合はこの抗体を用いて精製する方法などがある。

本発明の核酸構築物の具体例の構造を図4に示す。一本鎖DNA配列の5'末端側の構造としては、一本鎖DNA配列がループ領域を介して互いに相補的な二本鎖配列を形成しており、該ループ領域に親和性物質が結合しており、該二本鎖配列中に制限酵素認識部位が存在している構造（図4のT-splint1FB、T-splint4FB）、あるいは、相補DNA鎖と化学的に結合して互いに相補的な二本鎖配列を形成しており、該相補DNA鎖の3'末端に親和性物質が結合しており、該二本鎖配列中に制限酵素認識部位が存在している構造（図4のT-splint3FB、T-splint3FA、T-splint6FB、T-splint6FA）などが挙げられる。

なおここで言う「化学的に結合」の具体例としては、Psoralenを有する核酸と別の核酸とを混合して、紫外線を照射することによって両核酸を化学的に結合する場合、架橋剤により結合する場合、RNAリガーゼなどによって結合する場合、あるいは前述のY-ライゲーションによって結合する場合などが挙げられる。架

橋剤として具体的には、N－（6－マレイミドカプロイルオキシ）スクシイミド等の２価性試薬が挙げられる。

以下、本発明の核酸構築物の各構成要素について説明する。

（RNAに相補的な一本鎖DNA配列）

本発明の核酸構築物は、一本鎖RNAの３’末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列を３’末端側に含む。これにより、本発明では、互いに相補的な配列を有する一本鎖RNAと一本鎖DNAとを好適な条件下でアニーリングすることにより両者をアニーリングさせ、次いで、RNAリガーゼで処理することにより両者を効率よく連結することができる。

一本鎖RNAの３’末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列とは、互いにアニーリングすることができる配列であり、RNA配列に相補的な配列を有するDNA配列を言う。このような相補的な配列の長さは、両鎖がアニーリングすることができるのに十分な長さであれば特に限定されないが、一般的には１０から５０塩基、より好ましくは１０から３０塩基程度である。

本発明で用いる一本鎖DNAとしては、天然由来のDNAから作成した一本鎖DNAでもよいし、遺伝子組換え技術により作成した一本鎖DNAでもよいし、化学合成により作成した一本鎖DNAでもよい。

また、一本鎖DNAの構成要素である核酸の全てがデオキシリボヌクレオチドである必要はなく、その一部のみがDNAタイプであるものでもよく、それ以外の領域は、リボヌクレオチド（２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチドなどのRNAタイプ）でもデオキシリボヌクレオチド誘導体でもPNAタイプでもよい。また、ペプチドでも糖などが結合したものでもよい。

本発明で用いる一本鎖DNAの長さは、特に限定されないが、一般的には、数塩基から数百塩基程度であり、例えば１０塩基から５００塩基程度であり、より好ましくは２０塩基から２００塩基程度である。

（プライマー配列）

本発明の核酸構築物の一本鎖DNA配列の３’末端には、RNAの逆転写のた

めのプライマー配列が結合している。

本明細書で言う「一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列」とは、核酸構築物（T-Spacer）と一本鎖RNAとのライゲーションにより得られる核酸構築物を逆転写反応系に導入した場合に、逆転写反応を開始するためのプライマー配列として作用する塩基配列を意味し、一般的には、一本鎖RNAの配列と相補的な配列から構成されることが好ましい。

このようなRNAの逆転写のためのプライマーを有することにより、本発明の核酸構築物を用いればRNA-タンパク質複合体のRNAのDNA化も容易に可能である。即ち、本発明の核酸構築物は、逆転写プライマーの役割も持つため、*in vitro virus virion* をカラム等の固相に固定化するなどしてバッファー交換後、ただちに逆転写してRNAをDNA化し、*in vitro virus virion* を安定化することができる。従来の*in vitro virus virion* ではタンパク質翻訳系の反応液中から精製できず、しかも外から添加した逆転写プライマーを一本鎖RNAにハイブリダイゼーションさせるために温度を上げることが必要であったが、これは連結させたタンパク質を変性させる可能性があり大きな問題となっていた。本発明の核酸構築物ではこのような問題がなく、*in vitro virus virion* のDNA化による安定化が容易である。

（核酸誘導体を末端に有するスペーサー）

本発明の核酸構築物の一本鎖DNA配列には、核酸誘導体を末端に有するスペーサーが、枝分かれした状態で結合している。

このような一本鎖DNAの誘導体を使用して無細胞タンパク質翻訳系又は生細胞中でタンパク質の翻訳を行った場合、2本鎖でリボソームを止め、核酸誘導体（例えば、ピューロマイシンなど）がリボソームのAサイトに入れることによりタンパク質と結合させることができる。

この核酸誘導体としては、無細胞タンパク質翻訳系又は生細胞中でタンパク質の翻訳が行われた時に、合成されたタンパク質のC末端に結合する能力を有する化合物である限り限定されないが、その3'末端がアミノアシル tRNA に化学構造

骨格が類似しているものを選択することができる。代表的な化合物として、アミド結合を有するピューロマイシン (Puromycin)、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド (3'-N-Aminoacylpuromycin aminonucleoside、PANS-アミノ酸)、たとえば、アミノ酸部がグリシンの PANS-Gly、アミノ酸部がバリンの PANS-Val、アミノ酸部がアラニンの PANS-Ala、その他、アミノ酸部が全ての各アミノ酸に対応する PANS-アミノ酸化合物が挙げられる。

また、3'-アミノアデノシンのアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基が脱水縮合して形成されるアミド結合で連結した 3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド (3'-Aminoacyladenine aminonucleoside, AANS-アミノ酸)、たとえば、アミノ酸部がグリシンの AANS-Gly、アミノ酸部がバリンの AANS-Val、アミノ酸部がアラニンの AANS-Ala、その他、アミノ酸部が全アミノ酸の各アミノ酸に対応する AANS-アミノ酸化合物を使用できる。

また、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドとアミノ酸のエステル結合したものなども使用できる。さらにまた、核酸あるいは核酸に類似した化学構造骨格及び塩基を有する物質と、アミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質とを化学的に結合した化合物は、すべて本発明で用いられる核酸誘導体に含まれる。

核酸誘導体としては、ピューロマイシン、PANS-アミノ酸もしくはAANS-アミノ酸がリン酸基を介してヌクレオシドと結合している化合物がより好ましい。これらの化合物の中でピューロマイシン、リボシチジルピューロマイシン、デオキシシチジルピューロマイシン、デオキシウリジルピューロマイシンなどのピューロマイシン誘導体が特に好ましい。

本発明では、核酸誘導体はスペーサーを介して一本鎖DNAに結合している。スペーサーとしては、ポリエチレン又はポリエチレングリコールあるいはその誘導体などの高分子物質や、オリゴヌクレオチドやペプチドあるいはその誘導体などの生体高分子物質等が用いられ、好ましくはポリエチレングリコールが用いられる。スペーサーの長さは特に限定されないが、好ましくは、分子量150～6000であるか、または主鎖の原子数は10原子から400原子であり、さらに

好ましくは、分子量 600～3000 であるか、または主鎖の原子数が 40 原子から 200 原子である。

上記したような核酸誘導体は、それ自体既知の化学結合方法によって製造することができる。具体的には、リン酸ジエステル結合で合成ユニットを結合させる場合は、DNA 合成機に一般的に用いられているホスホアミダイド法などにより固相合成で合成することが可能である。ペプチド結合を導入する場合は、活性エステル法などにより合成ユニットを結合させるが、DNA との複合体を合成する場合は、両方の合成法に対応が可能な保護基が必要になる。

#### (制限酵素認識部位)

本発明の核酸構築物の好ましい態様においては、5' 末端側には、制限酵素認識部位が存在する。5' 末端側とは親和性物質に隣接する位置を意味する。制限酵素認識部位は通常は、DNA の 2 本鎖から構成される。このような制限酵素認識部位を導入することにより、*in vitro* virus virion を親和性物質から切り離すことができる。例えば、*in vitro* virus virion を親和性物質を介して固相に結合させている場合、*in vitro* virus virion を固相（支持体）上から切り離すことが可能になる。即ち、親和性物質同士（例えば、ビオチン-ストレプトアビジンなど）の結合等により支持体に強く結合した *in vitro* virus virion を 37℃ という温和な条件下で制限酵素によって切り離し精製することができる。制限酵素認識部位の配列は特に限定されず、PvuII など任意の制限酵素認識配列を使用することができる。

#### (親和性物質)

本発明の核酸構築物には、親和性物質が結合している。親和性物質を導入することにより、本発明の核酸構築物を作成した *in vitro* virus virion 並びにそれを用いた作成した各種核酸構築物を固相（支持体）に容易に結合させることができる。親和性物質の種類は特に限定されないが、例えば、ビオチン、ポリ A、各種の抗原又は抗体、FLAG、His タグなどが挙げられる。親和性物質は核酸構築物に上記したようなスペーサーを介して結合していてもよい。

## (2) RNA-DNA結合体とその製造

本発明によれば、上記(1)に記載した核酸構築物と一本鎖RNAとをアニーリングさせ、該核酸構築物の二本鎖領域の5'末端と一本鎖RNAの3'末端とをライゲーションさせることを特徴とする、RNA-DNA結合体の製造方法、並びに当該製造方法により製造されるRNA-DNA結合体が提供される。

本発明では、互いに相補的な配列を有する一本鎖RNAと一本鎖DNAとを好適な条件下でアニーリングすることにより両者をアニーリングさせ、次いで、RNAリガーゼで処理することにより両者を効率よく連結することができる。

本発明の方法ではまず、上記した互いに相補的な配列を有する一本鎖RNAと本発明の核酸構築とをアニーリングさせる。

アニーリングは上記した2種の核酸を適当な緩衝液(以後の操作の便宜上から言うと、RNAリガーゼ用の緩衝液が好ましい)に溶解し、高温から段階的に低温にすることにより行なうことができる。このような温度変化はPCR装置などを用いて行なうこともできる。アニーリング条件の一例としては、94℃から25℃まで10分かけて冷却するという条件が挙げられるが、これは一例にすぎず、温度および時間は適宜変更することができる。アニーリングの条件(緩衝液の組成、アニーリング温度、及びアニーリング時間など)は、アニーリング配列の長さや塩基組成などに応じて適宜設定することができる。

アニーリング反応における一本鎖RNAと、核酸構築物とのモル比はアニーリング反応が進行する限り、特に限定されないが、反応効率の観点からは、1:1~1:2.5程度であることが好ましい。

一本鎖RNAと核酸構築物とのアニーリング後、アニーリング産物では、一本鎖RNAの3'末端と核酸構築物の5'末端とが連結される。この連結は、一本鎖RNAの3'末端と核酸構築物の5'末端とが連結すればいずれの方法によってもよいが、例えば、RNAリガーゼ、架橋剤等、上述の「科学的結合」を行う具体例に挙げた方法等を用いることができる。

本発明で用いるRNAリガーゼは2つの一本鎖核酸同士を連結できるものであ

ればよく、好ましくはT4RNAリガーゼを使用できる。

なお、アニーリングの際の溶液としてRNAリガーゼの緩衝液として適当なものを使用した場合には、アニーリング生成物を含む溶液をそのままリガーゼ反応に使用することができ、そうでない場合には、アニーリング生成物を通常の核酸精製方法により回収した後、RNAリガーゼ用の緩衝液に溶解してリガーゼ反応用の溶液を調製する。

連結反応（リガーゼ反応）の条件は、使用するRNAリガーゼの活性が発揮される条件であればよく、例えば、好適な緩衝液（例えば、T4 RNA ligase buffer (50mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 1mM ATP) など）中で、25℃の温度一定で反応させたり、あるいは25℃で30分間と45℃で2分間のサイクルを反復した後に25℃で30分間反応させたりすることができる。ここに示した温度及び反応時間は一例に過ぎず反応効率が高くなるように適宜設定変更することができる。

反応後にエタノール沈殿などの常法により反応生成物を精製することにより、RNA-DNA結合体を得ることができる。このようにして得られるRNA-DNA結合体自体も本発明の範囲内である。

本発明で用いる一本鎖RNAの種類は特に限定されず、天然の組織又は細胞由来のRNAでも、DNAからインビトロで発現させたRNAでもよい。

また、一本鎖RNAの構成要素である核酸の全てがリボヌクレオチドである必要はなく、その一部のみがRNAタイプであるものでもよく、それ以外の領域は、リボヌクレオチド誘導体でもデオキシリボヌクレオチドタイプでもPNAタイプでもよい。また、ペプチドでも糖などが結合したものでもよい。

本発明で用いる一本鎖RNAの長さは、連結反応が可能である限り、特に限定されない。一般的には、一本鎖RNAの長さは、数十塩基から数十キロ塩基程度であり、例えば10塩基から50,000塩基程度であり、より好ましくは20塩基から10,000塩基程度である。

本発明で用いる一本鎖RNAは、蛋白質をコードする配列を含むことが好まし

く、具体的にはmRNA又はmRNAライブラリーであることが好ましい。

本発明の方法で得られるRNA-DNA連結体を転写翻訳系に導入するような場合には、連結すべき一本鎖RNAは、(1) プロモーター配列、(2) 翻訳の際にリボソームによって認識されるDNA配列、及び(3) 目的タンパク質をコードする配列が含まれていることが好ましい。さらに、FLAG、Hisタグ等のタグをコードする配列、あるいはPCRにより増幅するための共通配列を含むこともできる。

プロモーター配列の種類は、適用する発現系に適したものを適宜選択すればよく特に限定されない。例えば、大腸菌ウイルスT7のRNA polymeraseによって認識されるT7プロモーター配列、SP6プロモーター配列などが挙げられる。

翻訳の際にリボソームによって認識されるDNA配列としては、翻訳の際に真核細胞のリボソームによって認識されるRNA配列(Kozak配列)に対応するDNA配列や原核細胞のリボソームによって認識されるシャイン・ダルガノ配列(Shine-Dalgarno)、オメガ配列等のtabacco mosaic virusのリボソームによって認識される配列、rabbit  $\beta$ -globin、Xenopus  $\beta$ -globin あるいは bromo mosaic virus のリボソーム認識領域などが挙げられる。

目的タンパク質をコードする配列の種類は特に限定されず、目的に応じて適宜選択できる。

### (3) RNA-タンパク質複合体とその製造

さらに、本発明によれば、上記(2)に記載のRNA-DNA結合体をタンパク質翻訳系に導入して一本鎖RNAをタンパク質に翻訳することを特徴とする、RNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成るRNA-タンパク質複合体の製造方法、並びに当該製造方法により製造されるRNA-タンパク質複合体が提供される。

核酸からそれがコードするタンパク質を人工的に生成させるための転写翻訳系は当業者に公知である。具体的には、適当な細胞よりタンパク質合成能を有する成分を抽出し、その抽出液を用いて目的の蛋白質を合成させる無細胞蛋白質合成



系が挙げられる。このような無細胞蛋白質合成系には、リボゾーム、開始因子、伸長因子及び tRNA 等の転写・翻訳系に必要な要素が含まれている。

このような無細胞蛋白質合成系（細胞溶解物由来の系）としては、原核又は真核生物の抽出物により構成される無細胞翻訳系が挙げられ、例えば大腸菌、ウサギ網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液などが使用できるが、DNA 又は RNA から目的とする蛋白質を産生するものであればいずれでもよい。また、無細胞翻訳系はキットとして市販されているものを使用することができ、例えば、ウサギ網状赤血球抽出液（Rabbit Reticulocyte Lysate Systems, Nuclease Treated, Promega）や小麦胚芽抽出液（PRETEIOS, TOYOBO ; Wheat Germ Extract, Promega）などが挙げられる。

タンパク質翻訳系としては、生細胞を使用してもよく、具体的には、原核又は真核生物、例えば大腸菌の細胞などが使用できる。

無細胞翻訳系又は生細胞などは、その中にタンパク質をコードする核酸を添加又は導入することによってタンパク質合成が行われるものである限り制限されない。

本発明では、RNA-DNA 連結体を上記したような転写翻訳系に導入して一本鎖 RNA をタンパク質に翻訳した後、リボゾームを除去することによって、RNA と該 RNA によりコードされるタンパク質から成る RNA-タンパク質複合体を製造することができる。

#### （４）逆転写反応とその産物

本発明によれば、上記（２）に記載の RNA-DNA 結合体または上記（３）に記載の RNA-タンパク質複合体を逆転写反応に付することを特徴とする、核酸-タンパク質複合体の製造方法、並びに当該製造方法により製造される核酸-タンパク質複合体が提供される。

即ち、RNA 部分を含む核酸を逆転写酵素で処理することにより、RNA から DNA への逆転写が起こり、RNA 部分の塩基配列を DNA に転換することができる。逆転写反応に必要な試薬及び反応条件は当業者に周知であり、必要に応じ

て適宜選択することができる。

(5) 本発明の核酸構築物を用いて作製した核酸含有産物を固定化したチップ

本発明によれば、上記(2)に記載のRNA-DNA結合体、上記(3)に記載のRNA-タンパク質複合体、並びに上記(4)に記載の核酸-タンパク質複合体を支持体上に固定化したチップが提供される。

本発明の核酸構築物には親和性物質が結合している。従って、この親和性物質に親和性を有する物質を予め固定化した支持体に、本発明の核酸構築物を用いて作製した上記の核酸-タンパク質複合体を接触させることにより、当該核酸-タンパク質複合体を支持体上に容易に固定化することができる。このようにして作製されるチップは、核酸の機能の解析などにおいて有用である。

親和性物質の組み合わせとしては、ビオチン/ストレプトアビジン、ポリA配列/オリゴdT配列、抗原/抗体、His タグ配列/Ni、リガンド/レセプター、FLAG/抗FLAG抗体などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

チップの作製に用いる支持体としては、通常の核酸またはタンパク質の固定化に用いることができる支持体であれば特に限定されない。支持体としては、親和性物質同士の間の結合形成に悪影響を及ぼさないものであれば、その形状は特に限定されず、例えば、平板、マイクロウェル、ビーズ等の任意の形態をとることができる。支持体の材質としては、例えば、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックス；ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー類；シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、繊維物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルター等の多孔質物質を挙げることができる。

### (111) 核酸および/またはタンパク質の選択方法

#### (1) RNA-DNA結合体を調製する調製工程

本発明で用いる核酸構築物は、一本鎖RNAとそれがコードするタンパク質との結合体を作製するために使用するものであり、その構造は、一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列を3'末端側を含む。該核酸構築物は、該一本鎖DNA配列の3'末端に、該一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列を有し、核酸誘導体を末端に有するスペーサーが枝分かれした状態で結合している構造を有するものが好ましい。さらに、該一本鎖DNA配列の5'末端側に親和性物質が結合している構造を有するものも好ましい。このような核酸構築物の詳細は、本明細書中の上記(I)および(II)に記載した通りである。

## (2) 核酸-タンパク質複合体を構築する構築工程

上記により製造したRNA-DNA結合体を翻訳系に導入して一本鎖RNAをタンパク質に翻訳する。

核酸からそれがコードするタンパク質を人工的に生成させるための転写翻訳系は当業者に公知であり、明細書中の上記(I)および(II)に記載した通りである。

本発明では、RNA-DNA結合体 (in vitro virus genome) を上記したような翻訳系に導入して一本鎖RNAをタンパク質に翻訳した後、リボゾームを除去することによって、RNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成るRNA-タンパク質複合体 (in vitro virus virion) を製造することができる。

本発明においては、上記に記載のRNA-DNA結合体またはRNA-タンパク質複合体を逆転写反応に付することにより、RNA-DNA-タンパク質複合体として用いてもよい。さらに、得られたRNA-DNA-タンパク質複合体のRNAをRNA分解酵素などを用いて分解することによれば、DNA-タンパク質複合体が製造される。

即ち、RNA-タンパク質複合体のRNA部分を逆転写酵素で処理することにより、RNAからDNAへの逆転写が起こり、RNA部分の塩基配列をDNAに転換することができる。逆転写反応に必要な試薬及び反応条件は当業者に周知で

あり、必要に応じて適宜選択することができる。

かくして調製される核酸-タンパク質複合体には、さらに上記（I I）の方法によれば親和性物質を結合させることができる。従って、この親和性物質に結合しうる物質を予め固定化した支持体に、前記核酸構築物を用いて調製した核酸-タンパク質複合体を接触させることにより、当該核酸含有産物を支持体上に容易に固定化することができる。この固定化物を洗浄後、適当な方法、例えば適当な溶出液により溶出する、あるいは、核酸構築物中に存在する制限酵素認識部位を利用する等して支持体から切断して、核酸-タンパク質複合体を精製することができる。親和性物質とそれに結合しうる物質の組み合わせ、並びに支持体については、本明細書中の上記（I I）に記載した通りである。

### （3）核酸-タンパク質複合体を選抜する選抜工程

上記（2）で構築された *in vitro* virus virion 中のタンパク質が有する機能（生物活性）を用いて所望の機能を有するタンパク質を *in vitro* virus virion として選択して取得することができる。

この選抜工程とは、*in vitro* virus virion を構成するタンパク質部の機能（生物活性）を評価し、目的とする生物活性に基づいて *in vitro* virus virion を選択する工程を意味する。即ち、構築された *in vitro* virus virion と相互作用をし得る被験物質、例えばタンパク質、ペプチド、核酸、糖質、脂質、低分子化合物等との相互作用の有無や強弱に基づいて、*in vitro* virus virion を選択することができる。これらの被験物質は、前記した固相（支持体）に結合させて用いることもできる。このような工程はそれ自体既知の方法、例えば、Scott, J. K. & Smith, G. P. (1990) *Science*, 249, 386-390; Devlin, P. E. et al. (1990) *Science*, 249, 404-406; Mattheakis, L. C. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9022-9026 等に記載されている方法等により行うことができる。

選抜工程に付する *in vitro* virus virion は、上記RNA-タンパク質複合体でもよいし、RNA部分をDNAに逆転写した核酸-タンパク質複合体でもよい。このうち、核酸-タンパク質複合体を用いれば、核酸部分の安定性がよいため好

ましい。

#### (5) 増幅工程

上記(3)で選択された *in vitro* virus virion は、これを再度被検物質との相互作用に基づいて選抜することにより、該相互作用がより適当なタンパク質を選抜および取得することができる。一度選抜された *in vitro* virus virion を、再度被検物質と接触させるためには、選抜された *in vitro* virus virion の一本鎖RNA部分を必要に応じて逆転写する等した後に、これを増幅し、増幅されたDNA鎖をもとに(2)構築工程を行って *in vitro* virus virion を製造して、(3)選抜工程に付することにより可能となる。これら(1)調製工程、(2)構築工程、(3)選抜工程、(5)増幅工程を必要に応じてくりかえし行うことにより、被験物質との相互作用がより適当なタンパク質を選抜および取得することができる。

このうち、(1)および(2)の工程については上記(I)および(II)に詳述したとおりに行うことができる。ここで、選抜工程に供する *in vitro* virus virion は核酸-タンパク質複合体が好ましい。これにより以降の工程における *in vitro* virus virion の安定性等が増加する。

(5)増幅工程は、PCRを用いて、例えば以下のように行うことが好ましい。*in vitro* virus virion の核酸中、増幅するのは、少なくともタンパク質をコードしている部分(以下、これを「ORF」と称することがある)を含む領域である。該領域を増幅するのに用いられるPCRプライマーとしては、特に制限はないが、全ての *in vitro* virus virion に共通に用いられる配列として、5'側のプライマーは、ORFの5'上流側に連結されている配列が、また3'側のプライマーは、ORFの3'側に連結されている配列が好ましく用いられる。具体的には、上記(I)および(II)に記載の構造を有する *in vitro* virus virion の場合、5'側のプライマーは、翻訳の際にリボソームによって認識されるDNA配列などが好ましく用いられ、3'側のプライマーは、タグ配列や共通配列が好ましく用いられる。

かくして増幅されたDNAは、ORFのみを含むものであるので、上記（I）および（I I）に記載の（1）プロモーター配列、（2）翻訳の際にリボソームによって認識されるDNA配列（以下、これらを「5'側付加配列」と称することがある）、タグ配列、共通配列、並びにアニーリング配列、ブランチ配列など（以下、これらを「3'側付加配列」と称することがある）を結合する。これらの配列の結合は、DNAライゲース、下述するオーバーラップエクステンション法、PCR法を用いて行うことができる。PCRのプライマーとしては、増幅されたDNAの5'末端と共通の配列を3'末端に有する5'付加配列からなるものと、増幅されたDNAの3'末端と共通の配列を5'末端に有する3'付加配列からなるものが用いられる。

オーバーラップエクステンション法による結合方法は、まず増幅されたDNAの5'末端と共通の配列を3'末端に有する5'付加配列を用意し、これをアニーリングさせた後に、DNAポリメラーゼなどを用いて2本鎖DNAを合成し、さらに増幅されたDNAの3'末端と共通の配列を5'末端に有する3'付加配列を用意し、これをアニーリングさせた後に、DNAポリメラーゼなどを用いて2本鎖DNAを合成する方法である。上記の5'側付加配列および3'側付加配列の結合は、片方ずつ行っても、両方同時に行ってもよい。かくして合成された2本鎖DNAは、これを両末端の塩基配列を有するプライマー等を用いてさらにPCRで増幅してもよい。

#### （4）変異導入工程、（5）増幅工程、及び（6）検定工程

上記（3）で選択された *in vitro* virus virion(核酸-タンパク質複合体)の核酸部分に変異を導入し、増幅を行う。これら（1）調製工程、（2）構築工程、（3）選抜工程、（4）変異導入工程、（5）増幅工程を必要に応じて繰り返すことによりタンパク質の機能（生物活性）の改変及び新たな機能の創製が可能となる。この内、（1）及び（2）の工程については上記に詳述した構築方法に従って行うことができる。ここで、選抜工程に供する *in vitro* virus virionは逆転写を行ったものが好ましい。これにより、以降の工程における virion の安定

性等が増加する。

(4)変異導入及び(5)増幅の工程において、選択された *in vitro virus virion* の核酸部に必要に応じて変異を導入してPCR等で増幅する。ここで、*in vitro virus virion* の核酸部がmRNAの場合は、逆転写酵素によりcDNAを合成した後に変異の導入を行えば良く、核酸部の増幅は変異導入しながら行っても良い。変異導入は、すでに確立している Error-prone PCR (Leung, D. W., et al., (1989) J. Methods Cell Mol. Biol., 1, 11-15) や Sexual PCR (Stemmer, W. P. C. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 91, 10747-10751) を用いて容易に行うことができる。

さらに、変異が導入され増幅された *in vitro virus virion* の核酸部を用いて、

(1) 調製工程にてRNA-DNA結合体を調製し、それを用いて(2)構築工程にて核酸-タンパク質複合体を調製し、それを(3)選抜工程にかけ目的とする生物活性によって選択し、さらに(4)変異導入及び増幅を行うことができる。これらの工程を必要に応じて繰り返すことにより、タンパク質の機能改変及び新たな機能を有するタンパク質の創製が可能となる。

本発明のタンパク質-タンパク質またはタンパク質-核酸相互作用の検定方法における、核酸-タンパク質複合体を構築する構築工程は、一般には、(1)遺伝子ライブラリーやcDNAライブラリーからmRNAを合成し、*in vitro virus genome* (RNA-DNA結合体)を調製する調製工程、及び、(2)無細胞タンパク質合成系を利用して、mRNAとそれに対応するタンパク質とをリボソーム上で連結した *in vitro virus virion* を構築する構築工程を含む。

(1)の工程は、配列既知のDNAでORFに対応する配列を含むcDNAや配列未知のDNAで適当な制限酵素で断片化した断片を含むcDNAからRNAポリメラーゼを用いてmRNAを合成し、*in vitro virus genome* (RNA-DNA結合体)を構築することに相当する。

上記(1)の *in vitro virus genome* の構築と、(2)の *in vitro virus virion* の構築工程は、上記に詳述した方法に従って行うことができる。

in vitro virus virion と他のタンパク質や核酸（DNAまたはRNA）との相互作用を調べる検定工程（6）は、構築された核酸－タンパク質複合体の中から所望の機能をもつタンパク質を選抜する選抜工程（3）、必要に応じて、逆転写、増幅、配列決定等の工程も含まれる。

（3）の選抜工程では、標的のタンパク質や核酸（DNAまたはRNA）や他の物質、例えば糖質や脂質などをマイクロプレートやビーズに予め共有結合や非共有結合を介して結合させておき、これに（2）調製工程で調製した in vitro virus genome（RNA－DNA結合体）を加え、ある温度条件で、一定時間反応させた後、洗浄し、標的に結合しない in vitro virus virion を除去する。その後、標的に結合した in vitro virus virion を遊離させる。この工程は、前記の通り、すでに確立している方法で行うことができる。

（6）の検定工程には、（3）の選抜工程で遊離した in vitro virus virion を、例えばPCRにより増幅させ、増幅したDNAを直接あるいはクローニングした後、その配列を決定する工程も含まれる。相互作用の検出は、virion の逆転写後に行うのが好ましい。これにより、virion の安定性が増し、また相互作用の妨害作用も減少し、より精度の高い相互作用の検出が可能となる。

本発明の検出方法により、（1）配列既知あるいは未知の遺伝子DNAからmRNAを合成し、in vitro virus genome（RNA－DNA結合体）を構築し、（2）それを用いて in vitro virus virion を構築し、（3）in vitro virus virion のの中から標的のタンパク質あるいは核酸あるいは他の物質、たとえば糖質や脂質などと結合するもののみを選択し、（4）選択した in vitro virus virion を逆転写、増幅、クローニング、配列決定することにより、機能未知の遺伝子に対応する遺伝子産物（タンパク質）の機能を同定することが可能になる。

なお、本明細書における、上記した核酸の単離・調製、核酸の連結、核酸の合成、PCR、プラスミドの構築、無細胞系での翻訳等の遺伝子操作技術は、特に明記しない限り、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press に記載の方法またはそれに準じた方法により行

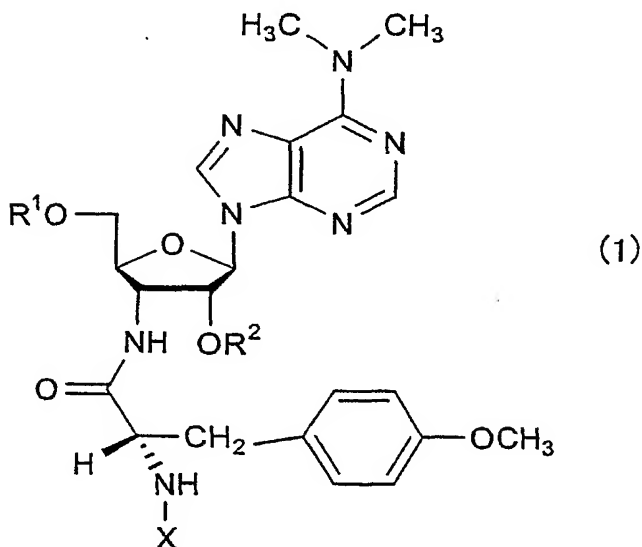


うことができる。

# (I V) ピューロマイシン誘導体およびその利用

## (1) ピューロマイシン誘導体

本発明は、下記式(1)で表されるピューロマイシン誘導体又はその塩に関する。



式(1)中、 $R^1$ は水素原子、又は水酸基の保護基を示し；

$R^2$ は水素原子又は反応性基を示し；

Xはアミノ酸残基あるいはペプチドを示し、Xにおいて、そのカルボキシル基がピューロマイシン中のアミノ基とアミド結合により結合しており、該アミノ酸残基あるいはペプチドの $\alpha$ アミノ基および側鎖の官能基は所望により保護されているもよい。

$R^1$ が示す水酸基の保護基としては、有機化学合成の分野で既知の保護基が挙げられ、具体的には、ジメトキシトリチル基の他に以下のものが挙げられる。

(エーテル型)

メチル基、メトキシメチル基、メチルチオメチル基、ベンジルオキシメチル基、*t*-ブトキシメチル基、2-メトキシエトキシメチル基、2, 2, 2-トリクロロエトキシメチル基、ビス(2-クロロエトキシ)メチル基、2-(トリメチル

シリル) エトキシメチル基、テトラヒドロピラニル基、3-ブロモテトラヒドロピラニル基、テトラヒドロチオピラニル基、4-メトキシテトラヒドロピラニル基、4-メトキシテトラヒドロチオピラニル基、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルS, S-ジオキシド基、テトラヒドロフラニル基、テトラヒドロチオフラニル基、トリイソプロピルシリルオキシメチル基 (TOM 基) ;

1-エトキシエチル基、1-メチル-1-メトキシエチル基、1-(イソプロポキシ)エチル基、2, 2, 2-トリクロロエチル基、2-(フェニルセレニル)エチル基、t-ブチル基、アリル基、シンナミル基、p-クロロフェニル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、o-ニトロベンジル基、p-ニトロベンジル基、p-ハロベンジル基、p-シアノベンジル基、3-メチル-2-ピコリルN-オキシド基、ジフェニルメチル基、5-ジベンゾスベリル基、トリフェニルメチル基、 $\alpha$ -ナフチルジフェニルメチル基、p-メトキシフェニルジフェニルメチル基、p-(p'-ブロモフェナシルオキシ)フェニルジフェニルメチル基、9-アントリル基、9-(9-フェニル)キサントニル基、9-(9-フェニル-10-オキシ)アントリル基、ベンズイソチアゾリルS, S-ジオキシド基、;

トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、イソプロピルジメチルシリル基、t-ブチルジメチルシリル基 (TBDMs 基)、(トリフェニルメチル)ジメチルシリル基、t-ブチルジフェニルシリル基、メチルジイソプロピルシリル基、メチルジ-t-ブチルシリル基、トリベンジルシリル基、トリ-p-キシリルシリル基、トリイソプロピルシリル基、トリフェニルシリル基 ;

(エステル型)

ホルメート、ベンゾイルホルメート、アセテート、クロロアセテート、ジクロロアセテート、トリクロロアセテート、トリフルオロアセテート、メトキシアセテート、トリフェニルメトキシアセテート、フェノキシアセテート、p-クロロフェノキシアセテート、2, 6-ジクロロ-4-メチルフェノキシアセテート、2, 6-ジクロロ-4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノキシアセテート、2, 4-ビス(1, 1-ジメチルプロピル)フェノキシアセテート、

クロロジフェニルアセテート、p-P-フェニルアセテート、3-フェニルプロピオネート、3-ベンゾイルプロピオネート、イソブチレート、モノスクシノエート、4-オキソペンタノエート、ピバロエート、アダマントエート、クロトネート、4-メトキシクロトネート、(E)-2-メチル-2-ブテノエート、ベンゾエート、o-(ジブロモメチル)ベンゾエート、o-(メトキシカルボニル)ベンゾエート、p-フェニルベンゾエート、2, 4, 6-トリメチルベンゾエート、p-P-ベンゾエート、 $\alpha$ -ナフトエート；

(カーボネート型)

メチルカーボネート、エチルカーボネート、2, 2, 2-トリクロロエチルカーボネート、イソブチルカーボネート、ビニルカーボネート、アリルカーボネート、シンナミルカーボネート、p-ニトロフェニルカーボネート、ベンジルカーボネート、p-メトキシベンジルカーボネート、3, 4-ジメトキシベンジルカーボネート、o-ニトロベンジルカーボネート、p-ニトロベンジルカーボネート、S-ベンジルチオカーボネート；

(その他)

N-フェニルカルバメート、N-イミダゾリルカルバメート、ボレート、ニトレート、N, N, N', N'-テトラメチルホスホロジアミダート、2, 4-ジニトロフェニルスルフェネート；

上記した保護基の導入法及び脱保護法は当業者に公知であり、例えば、Teodora, W.Green, Protective Groups in Organic Synthesis, John & Wiley & Sons Inc. (1981) などに記載されている。

R<sup>2</sup>が示す反応性基としては、連結基を介して末端に反応性の官能基を有する基が挙げられる。反応性の官能基としては、-COOH、-OH、-NH<sub>2</sub>、-CHO、-NHNH<sub>2</sub>、-NCS、エポキシ基、またはビニル基などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。R<sup>2</sup>が示す反応性基の好ましい例としては、末端にカルボキシル基(-COOH)を有する反応性基が挙げられ、特に好ましくは、スクシニル基(-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)である。

Xがペプチドを示す時、それに含まれる残基数は特に限定されないが、好ましくは2～10残基である。

Xが示すアミノ酸残基、あるいはペプチドに含まれるアミノ酸残基の種類は特に限定されず、天然型アミノ酸と非天然型アミノ酸の何れでもよく、Xが示す芳香族アミノ酸残基としては、芳香族基を含むアミノ酸であればその種類は特に限定されず、天然型アミノ酸でも非天然型アミノ酸の何れでもよく、また $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アミノ酸、 $\gamma$ -アミノ酸、 $\delta$ -アミノ酸の何れでもよいが、好ましくは天然型アミノ酸である $\alpha$ -アミノ酸である。

非天然型アミノ酸とは、天然型蛋白質を構成する天然型アミノ酸（全部で20種類）以外の全てのアミノ酸を意味し、具体的には、（1）天然型アミノ酸中の原子を他の物質で置換した非天然型アミノ酸、（2）天然型アミノ酸の側鎖の光学異性体、（3）天然型アミノ酸の側鎖に置換基を導入した非天然型アミノ酸、並びに（4）天然型アミノ酸の側鎖を置換して疎水性、反応性、荷電状態、分子の大きさ、水素結合能などを変化させた非天然型アミノ酸などが挙げられる。これらの非天然型アミノ酸残基についても、式（1）で表されるピューロマイシン誘導体をペプチダーゼあるいはプロテアーゼで処理することにより脱保護できる基であれば使用することができる。

Xが示すアミノ酸残基あるいはペプチドの好ましい例は、例えばペプチダーゼあるいはプロテアーゼがキモトリプシンである場合は芳香族アミノ酸残基であり、特に好ましくは $\alpha$ アミノ基がベンジルオキシカルボニル基などで保護されたフェニルアラニン残基である。

Xが示すアミノ酸残基あるいはペプチドは、該アミノ酸残基あるいはペプチドのカルボキシル残基がピューロマイシン中のアミノ基とアミド結合により結合している。

また、該アミノ酸残基あるいはペプチドの $\alpha$ アミノ基および側鎖のアミノ基は所望により保護されていてもよい。アミノ基の保護基としては、有機化学合成の分野で既知の保護基が挙げられ、具体的には、ホルミル基、C1-6アルキルカルボ

ニル基（例えばアセチル、エチルカルボニル等）、C 1－6 アルキル－スルホニル基、tert-ブチルオキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、アリルオキシカルボニル基、フルオレニルメチルオキシカルボニル基、アリールカルボニル基（例えばフェニルカルボニル、ナフチルカルボニル等）、アリールスルホニル基（例えばフェニルスルホニル、ナフチルスルホニル等）、C 1－6 アルキルオキシカルボニル基（例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル等）、C 7－10 アラルキル－カルボニル基（例えばベンジルカルボニル等）、メチル基、アラルキル基（例えばベンジル、ジフェニルメチル、トリチル基等）、フタロイル基等が用いられる。これらの基は1ないし3個のハロゲン原子（例えばフッ素、塩素、臭素等）、ニトロ基等で置換されていてもよく、その具体例としては、p-ニトロベンジルオキシカルボニル基、p-クロロベンジルオキシカルボニル基、m-クロロベンジルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基などが挙げられる。特に好ましいアミノ基の保護基の具体例としては、ベンジルオキシカルボニル基、tert-ブチルオキシカルボニル基が挙げられる。

また、該アミノ酸残基あるいはペプチドの側鎖のカルボキシル基、水酸基、メルカプト基、グアニジノ基、イミダゾール基なども、所望により有機化学合成の分野で既知の保護基を用いて保護されていてもよい。具体的には、カルボキシル基の保護基としてはエステル型としてメチル、エチル、t-ブチル、1-アダマンチル、ベンジル、2-フェニルイソプロピル、フェナシルなどが、水酸基の保護基としてはt-ブチル基、トリチル基、ベンジル基、2-ブロモベンジルオキシカルボニル基などが、メルカプト基の保護基としてはt-ブチル基、トリチル基、p-メトキシベンジル基、アセトアミドメチル基などが、グアニジノ基の保護基としてはp-トルエンスルホニル基、4-メトキシ2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル基、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル基などが、イミダゾール基の保護基としてはt-ブチルオキシカルボニル基、ベンジルオキシメチル基、トリチル基などがそれぞれ用いられる。

式（1）のピューロマイシン誘導体は、側鎖に存在する官能基の種類によって

は塩の形態で存在することができる場合があるが、そのような塩の形態の式(1)のピューロマイシン誘導体も本発明の範囲内である。

塩の種類は特に限定されないが、例えば、酸付加塩、金属塩、アンモニウム塩、又は有機アミン付加塩等が包含される。酸付加塩としては、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、又はクエン酸塩等の有機酸塩が挙げられる。金属塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、又は亜鉛塩等が挙げられ、アンモニウム塩としては、アンモニウム又はテトラメチルアンモニウム等の塩が挙げられ、有機アミン付加塩としては、モルホリン又はピペリジン等の付加塩が挙げられる。

式(1)のピューロマイシン誘導体には、位置異性体、幾何異性体、互変異性体、又は光学異性体のような異性体が存在するが、全ての可能な異性体、並びに2種類以上の該異性体を任意の比率で含む混合物も本発明の範囲内のものである。

また、式(1)のピューロマイシン誘導体又はその塩は、水あるいは各種溶媒との付加物(水和物又は溶媒和物)の形で存在することもあるが、これらの付加物も本発明の範囲内のものである。また、式(1)のピューロマイシン誘導体及びその塩の任意の結晶形も本発明の範囲内のものである。

式(1)で表されるピューロマイシン誘導体は、ペプチダーゼあるいはプロテアーゼで処理することにより、本明細書に定義した式(2)で表される化合物が生成する。このようなペプチダーゼあるいはプロテアーゼ処理によるピューロマイシン誘導体の脱保護方法も本発明の範囲内に属するものである。

ペプチダーゼあるいはプロテアーゼとしてはサーモライシン、キモトリプシン、エラスターゼ、ペプシン、プロテイナーゼ K、エンドプロテイナーゼ Glu-C などが挙げられるが、これらはピューロマイシンの $\alpha$ アミノ基を含むアミド結合を加水分解する酵素であれば特に限定されない。

Xが示すアミノ酸残基あるいはペプチドと、ペプチダーゼあるいはプロテアーゼの組合わせの好ましい具体例は、N-アルファ-ベンジルオキシカルボニルフェニル

アラニル基とキモトリプシンである。

## (2) ピューロマイシン誘導体の製造

本発明の式(1)で表されるピューロマイシン誘導体は以下の実施例に記載するように、ピューロマイシンを出発物質として使用し、それに含まれる官能基を修飾することにより製造することができる。例えば、 $N\alpha$ -( $N\alpha$ -ベンジルオキシカルボニルフェニルアラニル)-puromycin を製造する場合、ピューロマイシン2塩酸塩を適当な溶媒(例えば、水)に溶解した後、ジメトキシエタン(DME)と10%炭酸ナトリウム水溶液を加える。この溶液に benzyloxycarbonyl 基で保護されたフェニルアラニル-Osu を DME に溶かした溶液を加え、さらに 10%炭酸ナトリウム水溶液を加えて反応させることにより、目的化合物を合成することができる。

式(1)においてXが示す芳香族アミノ酸残基が $N\alpha$ -ベンジルオキシカルボニルフェニルアラニル基以外の基であるピューロマイシン誘導体を製造する場合は、benzyloxycarbonyl 基で保護されたフェニルアラニル-Osu の代わりに対応する試薬を使用すればよい。

上記で得られる誘導体(以下、ピューロマイシン誘導体Aと称する)は、式(1)において $R^1$ が水素原子を示し、 $R^2$ が水素原子を示すピューロマイシン誘導体である。式(1)において $R^1$ が水酸基の保護基を示すピューロマイシン誘導体は、ピューロマイシン誘導体Aの5'位の水酸基を保護することにより製造することができる。例えば、水酸基の保護基として、ジメトキシトリチル基を使用する場合は、ピューロマイシン誘導体Aを適当な溶媒(例えば、ピリジン)に溶解し、塩化ジメトキシトリチルを加えて反応させることにより、目的とする5'位の水酸基が保護されたピューロマイシン誘導体(以下、これをピューロマイシン誘導体Bと称する)を製造することができる。ジメトキシトリチル基以外の保護基を使用する場合は、塩化ジメトキシトリチルの代わりに対応する試薬を使用すればよい。

上記で得られるピューロマイシン誘導体Bは、式(1)において $R^1$ が水酸基の保護基を示し、 $R^2$ が水素原子を示すピューロマイシン誘導体である。式(1)において $R^1$ が水酸基の保護基を示し、 $R^2$ が反応性基を示すピューロマイシン誘導体

は、ピューロマイシン誘導体Bの2'位の水酸基に反応性基を導入することにより製造することができる。例えば、反応性基としてスクシニル基を使用する場合は、ピューロマイシン誘導体Bを適当な溶媒（例えば、ピリジン）に溶解し、無水コハク酸とジメチルアミノピリジンのピリジン溶液を加えて反応させることにより、目的とするピューロマイシン誘導体の2'位の水酸基に反応性基を導入した誘導体を製造することができる。スクシニル基以外の反応性基を使用する場合は、無水コハク酸とジメチルアミノピリジンの代わりに好適な反応性試薬を使用すればよい。

### （３）ピューロマイシン誘導体固定化支持体

本発明の式（１）のピューロマイシン誘導体は、支持体に結合することにより、ピューロマイシン誘導体固定化支持体として使用することができる。このようなピューロマイシン誘導体固定化支持体も本発明の範囲内に属するものである。

本発明のピューロマイシン誘導体固定化支持体は、以下の実施例に具体的に記載する通り、式（１）のピューロマイシン誘導体における $R^2$ が示す反応性基と、支持体中の反応性基とを反応させることにより製造することができる。

支持体としては、 $R^2$ が示す反応性基と反応して結合することができる官能基を有する支持体であればその種類は特に限定されないが、具体例としては、例えば、CPG LCA (CPG), NovaSyn TG amino resin (novabiochem), Amino PEGA resin (novabiochem), TentaGel S NH<sub>2</sub> SS (Advanced Chemtech)などが挙げられる。

### （４）ピューロマイシン誘導体の利用

本発明のピューロマイシン誘導体は液相での合成にも応用できるが、本発明者らは、以下の実施例に示す通り、先ず、２種類の固相担体に本発明のピューロマイシン誘導体を固定し、ホスホアミダイト法によりオリゴマーを合成したのちにピューロマイシンの $\alpha$ -アミノ基がZ-Phe基で保護されていること、及びZ-Phe基がキモトリプシン処理でほぼ定量的に脱保護されることを確認した。

Z-Phe基は疎水性が高いため、逆相高速液体クロマトグラフィ（逆相HPLC）による脱保護の確認と精製は極めて容易であった。合成機上で61ユニットから成る誘導体の合成を試みた場合も合成、脱保護ともに大きな問題は観察されず、さらに最



最終的に得られた誘導体は In Vitro Virus 法における応用で期待された活性を示し、Z-Phe 基がピューロマイシンの保護基として充分実用的であることが証明された。

上記の結果から分かるように、本発明のピューロマイシン誘導体はホスホアミダイト法に限らず、ピューロマイシンの誘導体を合成するための多くの合成法に適用することができる。さらに、酵素的に除去できる保護基を導入して選択的な反応を容易にするという考え方は、ピューロマイシン誘導体の合成に限らず合成手法が確立された核酸などの生体高分子の合成に幅広く応用することが可能である。

従って、本発明の式(1)で表されるピューロマイシン誘導体を含む核酸化合物は全て本発明の範囲内に属するものである。また、本発明のピューロマイシン誘導体又はピューロマイシン誘導体固定化支持体を用いた核酸化合物の製造方法も本発明の範囲内に属するものである。

即ち、本発明のピューロマイシン誘導体固定化支持体を通常ホスホアミダイト法に付し、 $\alpha$ アミノ基が保護されたピューロマイシン誘導体を3'-末端にもつ核酸化合物を通常アルカリ脱保護により支持体から切り出し、さらに精製を行うことにより、本発明のピューロマイシン誘導体を3'-末端に有する核酸化合物を製造することができる。

また、本発明の上記核酸化合物に種々の修飾反応を施したのち、酵素で処理することでピューロマイシンの $\alpha$ アミノ基を脱保護することも可能である。

本明細書で言う核酸化合物とは天然型の核酸のみならず、非天然型の核酸も含むものである。即ち、天然型の核酸を構成するヌクレオチドあるA、G、C、T及びUのみで構成される核酸のみでなく、これらの修飾ヌクレオチドが含まれていてもよい。修飾ヌクレオチドの具体例としては、ビオチン化d T、Amino modifier C6 dT、フルオレセイン d Tなどが挙げられる。また、核酸化合物の中には適当なスペーサー基が存在してもよく、スペーサー基の具体例としては、ポリエチレン又はポリエチレングリコールなどの高分子が挙げられる。

#### (V) 支持体タンパク質およびその利用

本発明は、ペプチド及びタンパク質の機能を損なうことなく提示するための支持体タンパク質に関するものであり、特に *in vitro virus* 法等で無細胞翻訳系中で種々のタンパク質を提示させ、その中から機能性タンパク質（ペプチド）を取得する際に用いるものである。

支持体タンパク質としては、一般的には、以下の条件を満たすものが好ましい。

(1) 球状タンパク質であってフォールディングしやすい、(2) 安定性がある、(3) ジスルフィド (S-S) 結合を含まない等である。本発明者らは今回、これらの条件を満たすタンパク質として Oct-1 の Pou-specific domain (73 アミノ酸残基) (Dekker, N. et al. (1993) Nature 362, 852-854) を選んだ。このタンパク質は1つだけ Cys 残基を含むため、この Cys 残基を Ala 残基に置換した変異体を作成した (配列番号 21)。このようなタンパク質は提示しようとするペプチドに Cys が含まれていてもこの支持体タンパク質と S-S 結合して構造を変えることはない。また、このタンパク質は N 末端側と C 末端側が離れているためにランダムなペプチドを N 末端側に提示した際に、C 末端側にあるスペーサ部分 (*in vitro virus* 法の場合) と相互作用しにくいと考えられる。このタンパク質は4つの  $\alpha$  ヘリックスからなりフォールディングしやすいと考えられ、また、無細胞翻訳系においては短いペプチドは発現されにくいことから、このような支持体と融合タンパク質を作る必要性がある。

従って、機能ペプチドを取得可能な形で提示できるこのような支持体用タンパク変異体は無細胞翻訳系を用いる *in vitro virus* 法等の技術で今後、重要な役割を担うと考えられる。

本発明の支持体タンパク質は、30から200アミノ酸残基からなる球状タンパク質から成ることを特徴とする。好ましくは、システイン残基を含まず、 $\beta$ シート構造を有さず、 $\alpha$ ヘリックス構造からなり、立体構造においてN末端とC末端が離れていることが好ましく、また他の生体高分子と相互作用しないタンパク質であることが好ましい。

本発明において、目的ペプチド又は目的タンパク質は特に限定されず、スクリ

ーニングの目的に応じて任意の性質を有するペプチド又はタンパク質を、本明細書で言う目的ペプチド又は目的タンパク質として使用することができる。

例えば、レセプターに結合可能なリガンド、細胞内への移行性に寄与する移行シグナルペプチド又はシグナルタンパク質、またはスクリーニングに用いる多数の不特定のランダムペプチドなどを挙げることができる。これらの目的ペプチドまたは目的タンパク質は、標的物質を、主にタンパク質－タンパク質相互作用により認識する。従って、目的タンパク質は、標的物質を直接または間接的に相互作用により十分認識可能であるものが好ましい。なお、前記レセプターとしては、例えば、細胞表面の受容体タンパク質、抗体、増殖因子等がある。さらに、本発明の目的タンパク質は、DNA、RNAなどのポリヌクレオチドに結合するものであってもよい。

本発明における好ましい実施形態の1つとしては、特定のターゲットとの特異的な相互作用を有する特定のアミノ酸配列を有する目的タンパク質を、スクリーニングし、さらには同定するために、ランダムに選ばれた連続する、または不連続なアミノ酸配列を有するランダム配列を目的ペプチドと使用することができる。例えば10個のランダムに選ばれた20種類のアミノ酸からなる組合せは理論上約 $1 \times 10^{13}$ 種類（約10兆個）となり、スクリーニングにより特定アミノ酸配列を検出するには十分と考えられる。

本発明においては、目的ペプチド又は目的タンパク質としてランダムに選ばれるアミノ酸の数に特に制限はない。当業者に公知の合成手段を用いることにより、所望の数の、好ましくは3から40個のランダムペプチドを合成することは当業者には容易である。例えば、このようなランダムペプチドをコードするDNAの合成は、市販の自動DNA合成装置等を用いても可能である。

本発明の特に好ましい実施形態において、目的ペプチドとしてランダムペプチドを呈示させる場合、該ランダムペプチドをコードするDNA（ランダムDNA）は、好ましくは式： $(NNK)_n$ （式中、NはA、G、C、またはTの何れかのデオキシリボヌクレオチドであり、KはGまたはTの何れかのデオキシリボヌクレ

オチドであり、nはこれらランダム部分のアミノ酸数を表す。)によって表すことができる。本発明では、nは、少なくとも3以上であることが好ましく、さらに好ましくは5から40アミノ酸をコードする数であることが望ましい。但し、このnの数の制限は、該ランダムDNAの合成手法によって制限されるものではなく、nの数の上限に実質上の制限はない。

また、目的タンパク質の両側に（N端側及びC端側）にシステインを付加して含ませることにより、目的タンパク質を効率よく呈示させることができる場合がある。ここでいう目的タンパク質のN端側とは、目的タンパク質のN末端の場合のみならず目的タンパク質のN末端から数個から数十個のアミノ酸を隔てた場所のいずれの場合をも含み、また目的タンパク質のC端側とは、目的タンパク質のC末端の場合のみならず目的タンパク質のC末端から数個から数十個のアミノ酸を隔てた場所のいずれの場合をも含む意味である。

システインを介して分子中にループを有する分子には、免疫グロブリンファミリーの免疫グロブリン（IgG、IgM）、T細胞受容体、MHCクラスII分子、LFA-3、ICAM-1、VCAM-1等が知られている。ループを形成させるのに適した目的タンパク質の大きさは、これら既知の分子を参照して設計可能である。

本発明の支持体タンパク質の具体例としては、下記の何れかのアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

- (1) 配列番号21に記載のアミノ酸配列；又は
- (2) 配列番号21に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、付加および／または挿入しているアミノ酸配列であって、球状タンパク質を構成するアミノ酸配列；

本明細書において、「アミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、付加および／または挿入しているアミノ酸配列」における1から数個とは一般的には1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

さらに、本発明は、目的ペプチド又は目的タンパク質と上記した本発明の支持体タンパク質とから成る融合タンパク質にも関する。上記融合タンパク質は、例えば、目的ペプチド又は目的タンパク質をコードする塩基配列および本発明の支持体タンパク質をコードする塩基配列が直接またはリンカーを介して連結してなる、目的ペプチド又は目的タンパク質と支持体タンパク質とから成る融合タンパク質をコードする核酸またはその修飾体を、無細胞翻訳系または生細胞において発現させることにより調製することができる。

本発明における、融合タンパク質をコードする核酸とは、支持体タンパク質をコードする核酸と目的ペプチド又は目的タンパク質をコードする核酸とを含む核酸である。上記核酸は、上記融合タンパク質を機能的に提示する性質を損なわない限り、任意の位置、例えば、支持体タンパク質をコードする核酸と目的ペプチド又は目的タンパク質をコードする核酸との間に、スペーサーその他の任意のアミノ酸をコードするDNAを含んでいてもよい。

本発明の核酸の合成は、市販の自動DNA合成装置等を用いて当業者であれば容易に行うことができる。また、配列番号21に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、付加および／または挿入しているアミノ酸配列であって、球状タンパク質を構成するアミノ酸配列をコードする核酸も同様に市販の自動DNA合成装置等を用いて合成することができる。

本発明においては、スクリーニング後に、公知の生物学的手法を適用することによって、目的ペプチド又は目的タンパク質を分離回収することができる。例えば、支持体タンパク質と目的ペプチド又は目的タンパク質の間に適当なスペーサーアミノ酸配列を設けることにより好適に該目的タンパク質を分離することができる。このようなスペーサーアミノ酸配列の挿入は公知の分子生物化学的手法に基づいて行うことができる。例えば、目的のアミノ酸配列をコードするDNAを任意の位置に、公知の遺伝子操作技術を用いて挿入することができる。例えば、スペーサーをトロンビンにより切断するような場合には、(Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser) をコードするDNA (CTG-GTT-CCG-CGT-GGA-TCC)

を支持体タンパク質と目的ペプチド又は目的タンパク質との間に導入することにより、該ペプチドが発現し、トロンビンにより切断可能となる。同様に、スパーサーを FactorXa で切断する場合においては、(Ile-Glu-Gly-Arg-X, Xは Arg, Pro 以外のアミノ酸) をコードする DNA (ATC-GAA-GGT-CGT-YYY、YYY は Arg, Pro をコードしない DNA) を導入すればよい。

本明細書で言う「核酸またはその修飾体」における修飾体の種類は特に限定されず、当分野で公知の任意の核酸修飾体を包含する。本発明で利用できる核酸修飾体の一つの具体例としては、その 3' 末端に核酸誘導体が結合しているものが挙げられる。即ち、本発明の好ましい実施態様では、目的ペプチド又は目的タンパク質をコードする塩基配列および本発明の支持体タンパク質をコードする塩基配列が直接またはリンカーを介して連結してなる目的ペプチド又は目的タンパク質と支持体タンパク質とから成る融合タンパク質をコードする mRNA であって、その 3' 末端に核酸誘導体が結合している mRNA を、無細胞翻訳系または生細胞において発現させることにより、融合タンパク質とそれをコードする核酸とから成る複合体が製造される。

また、3' 末端に核酸誘導体が結合している mRNA を使用して無細胞タンパク質翻訳系又は生細胞中でタンパク質の翻訳を行った場合、2 本鎖でリボソームを止め、ピューロマイシンなどの核酸誘導体がリボソームの A サイトに入れることによりタンパク質と結合させることができる。

この核酸誘導体としては、無細胞タンパク質翻訳系又は生細胞中でタンパク質の翻訳が行われた時に、合成されたタンパク質の C 末端に結合する能力を有する化合物である限り限定されないが、その 3' 末端がアミノアシル tRNA に化学構造骨格が類似しているものを選択することができる。代表的な化合物として、アミド結合を有するピューロマイシン (Puromycin)、3' -N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド (3' -N-Aminoacylpuromycin aminonucleoside、PANS-アミノ酸)、たとえば、アミノ酸部がグリシンの PANS-Gly、アミノ酸部がバリンの PANS-Val、アミノ酸部がアラニンの PANS-Ala、その他、アミノ酸部が全ての各

アミノ酸に対応する PANS-アミノ酸化合物が挙げられる。

また、3'-アミノアデノシンのアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基が脱水縮合して形成されるアミド結合で連結した 3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド (3'-Aminoacyladeniosine aminonucleoside, AANS-アミノ酸)、たとえば、アミノ酸部がグリシンの AANS-Gly、アミノ酸部がバリンの AANS-Val、アミノ酸部がアラニンの AANS-Ala、その他、アミノ酸部が全アミノ酸の各アミノ酸に対応する AANS-アミノ酸化合物を使用できる。

また、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドとアミノ酸のエステル結合したものなども使用できる。さらにまた、核酸あるいは核酸に類似した化学構造骨格及び塩基を有する物質と、アミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質とを化学的に結合した化合物は、すべて本方法において用いられる核酸誘導体に含まれる。

核酸誘導体としては、ピューロマイシン、PANS-アミノ酸もしくはAANS-アミノ酸がリン酸基を介してヌクレオシドと結合している化合物がより好ましい。これらの化合物の中でピューロマイシン、リボシチジルピューロマイシン、デオキシシチジルピューロマイシン、デオキシウリジルピューロマイシンなどのピューロマイシン誘導体が特に好ましい。

本発明の方法では、融合タンパク質をコードする核酸又はその修飾体として、3'末端に核酸誘導体がスペーサーを介して結合している核酸修飾体を使用することが好ましい。

スペーサーとしては、ポリエチレン又はポリエチレングリコールあるいはその誘導体などの高分子物質や、オリゴヌクレオチドやペプチドあるいはその誘導体などの生体高分子物質等が用いられ、好ましくはポリエチレングリコールが用いられる。スペーサーの長さは特に限定されないが、好ましくは、分子量150～6000であるか、または主鎖の原子数は10原子から400原子であり、さらに好ましくは、分子量600～3000であるか、または主鎖の原子数が40原子から200原子である。

上記したような核酸誘導体は、それ自体既知の化学結合方法によって製造する

ことができる。具体的には、リン酸ジエステル結合で合成ユニットを結合させる場合は、DNA合成機に一般的に用いられているホスホアミダイド法などにより固相合成で合成することが可能である。ペプチド結合を導入する場合は、活性エステル法などにより合成ユニットを結合させるが、DNAとの複合体を合成する場合は、両方の合成法に対応が可能な保護基が必要になる。

本発明の方法では、上記した核酸またはその修飾体を、タンパク質翻訳系または生細胞において発現させることにより融合タンパク質を製造することが好ましい。核酸からそれがコードするタンパク質を人工的に生成させるための転写翻訳系は当業者に公知である。具体的には、本明細書中の上記（I I）に記載した通りである。

かくして得られた上記融合タンパク質とそれをコードする核酸の複合体又は本発明の目的ペプチド又は目的タンパク質と支持体タンパク質とから成る融合タンパク質を目的タンパク質として上記（I）および（I I）に記載の方法により構築された *in vitro* virus virion は、上記（I I I）の選抜工程、（4）変異導入工程、（5）増幅工程などを適宜行なうことにより、所望のポリペプチドまたはタンパク質を取得することができる。本発明には、上記の工程で得られる *in vitro* virus virion も含まれる。

さらに本発明では、目的ペプチド又は目的タンパク質としてペプチドライブラリー又はタンパク質ライブラリーを使用することができる。このようなライブラリーを本発明の支持体タンパク質と融合させた形態で発現させて得られる融合タンパク質をスクリーニングし、所望の機能を有する目的ペプチド又は目的タンパク質を選択することにより、機能性ペプチド又はタンパク質をスクリーニングすることができる。

#### （V I）核酸の連結方法およびその利用

本発明の核酸の連結方法は、ランダムな配列を含む多様性のあるDNAライブラリ断片と、転写・翻訳のための配列、タグをコードする配列、あるいは支持体



タンパク質をコードする配列のようなコンスタントな配列（以下、これらを「コンスタント配列」と称することがある）をもつDNA断片とを多様性を損なわない形で連結させる場合に使用することができる。また、本発明は、そのようにして連結したDNAを鋳型にした転写による、in vitro virus virion 製造用の一本鎖RNAの製造に関するものである。

本発明の核酸の連結方法は、互いに相補的な共通配列を有する異なる2種類以上の1本鎖または2本鎖DNAをプライマーの非存在下においてDNA合成酵素を用いて反応させることを特徴とする。

互いに相補的な共通配列とは、好適な条件下でアニーリングできる程度の相補性を有していればよく、完全（即ち、100%）に相補的である必要はない。また、相補配列の長さも特に限定されないが、通常は5塩基から100塩基、好ましくは5塩基から50塩基程度である。

DNA合成酵素は、各種のDNAポリメラーゼを使用できるが、好ましくはTaqポリメラーゼである。本発明では、Taqポリメラーゼを用いるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によりDNAを連結するのが好ましい。

TaqポリメラーゼなどのDNAポリメラーゼを用いた核酸合成反応は当業者に公知の通常の条件下で行うことができる。具体的には、連結すべき2種類のDNA断片、dNTP混合物及びDNAポリメラーゼを好適な緩衝液に添加し、好適な温度で一定時間インキュベートすることにより核酸合成反応を行うことができる。核酸合成反応をPCRにより行う場合には、DNAポリメラーゼとしてTaqポリメラーゼを使用し、例えば、95℃で30秒（変性）、54℃で2秒（アニーリング）、及び74℃30秒（伸長）のサイクルを複数回（例えば、25回程度）繰り返すことにより核酸合成を行うことができる。PCR反応の条件（温度及び時間、サイクル数）などは連結すべき核酸の種類などに応じて適宜変更することができる。

本発明は上記した方法により得られるDNAの連結体も包含する。

本発明の好ましい態様では、異なる2種類以上の1本鎖または2本鎖DNAの

うちの片方のDNAがDNAライブラリーなどである。他方のDNAがコンスタント配列を有するDNAである。

本発明において、目的配列の種類は特に限定されず、スクリーニングの目的に応じて任意の配列を使用することができる。目的配列の具体例及び好ましい実施形態については、本明細書中の上記（V）に記載した通りである。

本発明の好ましい態様では、異なる2種類の1本鎖または2本鎖DNAのうちの他方のDNAはコンスタント配列を有するDNAである。

コンスタント配列として用いられる支持体タンパク質としては、30から200アミノ酸残基からなる球状タンパク質から成る支持体タンパク質を用いることが好ましい。さらに好ましくは、システイン残基を含まず、タンパク質の二次構造として $\beta$ シート構造を有さず、 $\alpha$ ヘリックス構造からなり、タンパク質の立体構造においてN末端とC末端が離れていて、他の生体高分子と相互作用しない支持体タンパク質を使用することができる。

上記したような支持体タンパク質の具体例としては、下記の何れかのアミノ酸配列を有する支持体タンパク質が挙げられる。

（1）配列番号21に記載のアミノ酸配列；又は

（2）配列番号21に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、付加および／または挿入しているアミノ酸配列であって、球状タンパク質を構成するアミノ酸配列：

本明細書において、「アミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、付加および／または挿入しているアミノ酸配列」における1から数個とは一般的には1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

なお、本発明で用いるDNAの合成は、市販の自動DNA合成装置等を用いて当業者であれば容易に行うことができる。また、配列番号21に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、付加および／または挿入しているアミノ酸配列であって、球状タンパク質を構成するアミノ酸配列をコードす

る核酸も同様に市販の自動DNA合成装置等を用いて合成することができる。

さらに本発明によれば、(1)互いに相補的な共通配列を有する異なる2種類の1本鎖または2本鎖DNAをプライマーの非存在下においてDNA合成酵素を用いて反応させることにより、連結したDNAと連結しないDNAを含む混合物を調製する工程；及び

(2) 工程(1)で得た混合物を用いてRNAポリメラーゼの存在下で転写反応を行いRNAを合成する工程；

を含む、核酸を連結及び転写するための方法が提供される。

上記工程(1)は本明細書中上記した通り行うことができる。

上記工程(2)は、工程(1)で得られる連結したDNAを転写してRNAを生成する工程である。工程(1)で得られる反応混合物中には、連結したDNAと連結しないDNAの両方が含まれている。本発明では、この反応混合物をそのまま用いてRNAポリメラーゼの存在下で転写反応を行うことにより、連結されたDNAのみが転写される。これは、T7RNAポリメラーゼ等のウイルス由来のRNAポリメラーゼはプロモータ特異性が高く、2本鎖DNAを特異的に認識するという性質を利用しているためである。即ち、本発明では、上記したようなプロモータ特異性が高く、2本鎖DNAを特異的に認識するウイルス由来のRNAポリメラーゼを使用することが好ましく、T7RNAポリメラーゼを使用することが特に好ましい。このようなRNAポリメラーゼを使用することにより、反応混合物の精製操作をせずにRNAを合成することができる。

上記転写反応により得られた反応混合物をDNA分解酵素で処理することにより混合物中に存在するDNAを分解し、除去することにより、ランダム配列の多様性を維持したままRNAのみを単離することができる。本発明は上記した方法により得られるRNAも包含する。

さらに本発明は、(1)互いに相補的な共通配列を有する異なる2種類の1本鎖または2本鎖DNAをプライマーの非存在下においてDNA合成酵素を用いて反応させることにより、連結したDNAと連結しないDNAを含む混合物を調製す

る工程；

(2) 工程(1)で得た混合物を用いてRNAポリメラーゼの存在下で転写反応を行いRNAを合成する工程；

(3) DNA分解酵素でDNAを分解する工程；及び

(4) 工程(3)で得たRNAを含む核酸構築物を、無細胞翻訳系または生細胞において発現させる工程を含む、タンパク質の製造方法；並びに、

(1) 互いに相補的な共通配列を有する異なる2種類の1本鎖または2本鎖DNAをプライマーの非存在下においてDNA合成酵素を用いて反応させることにより、連結したDNAと連結しないDNAを含む混合物を調製する工程；

(2) 工程(1)で得た混合物を用いてRNAポリメラーゼの存在下で転写反応を行いRNAを合成する工程；

(3) DNA分解酵素でDNAを分解する工程；及び

(4) 工程(3)で得たRNAの3'末端を核酸誘導体で修飾する工程；及び

(5) 工程(4)で得た3'末端を核酸誘導体で修飾したRNAを、無細胞翻訳系または生細胞において発現させる工程を含む、タンパク質とそれをコードする核酸との複合体の製造方法を提供する。また、上記(3)で得られたRNAを用いて上記(I)または(II)に記載の方法により *in vitro* virus virion を製造することができる。

上記したような3'末端に核酸誘導体が結合しているmRNAを使用して無細胞タンパク質翻訳系又は生細胞中でタンパク質の翻訳を行った場合、2本鎖でリボソームを止め、ピューロマイシンなどの核酸誘導体がりボソームのAサイトに入れることによりタンパク質と結合させることができる。この核酸誘導体としては、本明細書中の上記(V)に記載したものが挙げられる。

本発明の方法では、RNAの3'末端に核酸誘導体がスペーサーを介して結合している核酸修飾体を使用することが好ましい。スペーサーとしては、本明細書中の上記(V)に記載したものが挙げられる。

上記したような核酸誘導体は、それ自体既知の化学結合方法によって製造する

ことができる。具体的には、本明細書中の上記（V）に記載した通りである。

本発明の方法では、上記した核酸またはその修飾体を、無細胞翻訳系または生細胞において発現させることによりタンパク質を製造することが好ましい。

核酸からそれがコードするタンパク質を人工的に生成させるための転写翻訳系は当業者に公知であり、具体的には、本明細書中の上記（I I）に記載したものが挙げられる。

本発明では、目的配列としてペプチドライブラリー又はタンパク質ライブラリーをコードする配列を使用することができる。このようなライブラリーDNAを本発明の核酸の連結方法に従って支持体タンパク質と連結した形で機能的に発現させたものをスクリーニングし、所望の機能を有する目的ペプチド又は目的タンパク質を選択することにより、機能性ペプチド又はタンパク質をスクリーニングすることができる。

## 実施例

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。なお、本発明によるY-ライゲーション法を用いた *in vitro* virus のゲノム構築の模式図を図2に示す。

### 実施例 1

実施例 1-A : Thioredoxin mRNA と DNA 断片のライゲーション及びこの DNA 断片からの逆転写

#### （1）転写用 DNA の構築と mRNA の作成

転写効率の高い大腸菌ウイルス T7 の RNA polymerase によって認識される DNA 配列（T7 プロモーター配列）と翻訳の際に真核細胞のリボソームによって認識される DNA 配列（Kozak 配列）と原核細胞のリボソームによって認識される（シャイン・ダルガノ配列：Shine-Dalgarno）を有し、その下流に Thioredoxin をコードした DNA を次のように構築した。

まず、T7 プロモーター配列 (Rosenberg, A.H., et al., Gene, 56, 125-135 (1987)) と Kozak コンセンサス配列及び Shine-Dalgarno 配列を含む 1 本鎖 DNA (配列番号 1) を有機合成し、これを鋳型にして、DNA プライマー (配列番号 2) と thioredoxin の一部をコードしたプライマー (配列番号 3) によってポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。DNA 合成酵素は、KOD Taq Polymerase (TOYOBO 製) を用いた。PCR の条件は、95℃ 20 秒、68℃ 2 秒、74℃ 15 秒のサイクルを 30 回繰り返した。この PCR 産物は、プライマーを除去するために、プライマーリムーバー (エッジサイエンス) でフェノール抽出後、エタノール沈殿した。

一方、thioredoxin を載せた pTrxFus プラスミド (Invitrogene 社製) を鋳型として配列番号 3 のアンチセンスプライマー (配列番号 4) と DNA プライマー (配列番号 5) を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行うことにより、thioredoxin をコードした DNA 領域を増幅した。PCR の条件は、95℃ 20 秒、68℃ 20 秒、74℃ 20 秒のサイクルを 25 回繰り返した。PCR 産物はフェノール抽出後、プライマーリムーバーでエタノール沈殿した。

尚、DNA プライマー (配列番号 5) は T4 RNA ligase の基質としてより適当な AAA の配列を mRNA が持つようにデザインされている。

上記した 2 つの PCR 産物を重複伸長 (Overlap extension) 法 (Horton RM, et al. (1989) Gene 77, 61-68) に従って結合させ、2 つのプライマー (配列番号 2 と配列番号 5) で T7 プロモーター配列-Kozak コンセンサス配列-Shine-Dalgarno 配列-Thioredoxin を作成した。いずれの PCR においても DNA 合成酵素は KOD Taq Polymerase (TOYOBO 製) を用いた。

上記した方法で作成した DNA を、反応液 100  $\mu$ l 当たり 10  $\mu$ g 加え、RNA 合成キット Ribomax Large Scale RNA Production System (Promega 社製) を使って mRNA に転写した。翻訳効率を上げるためにキャップアナログ (RNA capping Analog; Gibco BRL 社製) を最終濃度が 7.2 mM になるように加え、mRNA の 5' 側を修飾した。キャップアナログおよび過剰の NTP (ヌクレオチド 3 リン酸) を除

去するために、プライマー除去剤 (Primer Remover: Edge Biosystems 社製) を使ってエタノール沈殿を行った。

#### (2) 連結用DNAの作製

RT-thio (配列番号6) は、日本製粉で合成された。RT-thio は thioredoxin の一部をアンチセンス配列としてもっている。

#### (3) mRNA と RT-thio のアニーリング条件

Thioredoxin mRNA 及び RT-thio を 1 : 1.5 の割合 (モル比) で混合し、T4 RNA ligase buffer (50mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 1mM ATP) に溶解し、特異性を上げるため変性剤として DMSO (Dimethyl sulfoxide) を最終濃度 5 % になるように加えた。

PCR 装置を用いて、94℃～25℃まで10分かけて冷却することによりアニーリングした。

#### (4) T4 RNA ligase によるライゲーション反応

(3) でアニーリングした溶液中に T4 RNA ligase を 25 unit と T4 polynucleotide kinase 10unit 加え、25℃で15分間反応させた。

反応後、Rneasy Mini (QIAGEN 社) を行ってライゲーション産物を精製した。

#### (5) ライゲーション反応の確認

ライゲーションの効率を確認するために、6%アクリルアミド8M尿素変性ゲル電気泳動、65℃、220V、120mA、50分の条件でサンプルを流し、Vistra Green (Amersham pharmacia 社) で染色し、Molecular Imager (Bio Rad 社) で画像化した。結果を図5に示す。

図5において、左のレーンは分子量マーカを示し、真中のレーンは元のmRNAを泳動したものを示し、右のレーンはライゲーション産物を泳動したものを示す。変性条件下で電気泳動した場合で、ライゲーション産物の方が元のmRNAよりも分子量が大きくなっていることからライゲーション反応が行なわれていることが確認された。

#### (6) RT-thio による逆転写の確認

RT-thio がライゲーシオンされた精製した mRNA が実際に逆転写できるかどうかを確認した。8pmol の RT-thio が 3' 末端に結合した mRNA を AMV Reverse Transcriptase (Promega) を用いて逆転写した。その後、半分を RNase H (Takara) 2 units で分解し、逆転写した DNA があるかどうか確認した。結果を図 6 に示す。

図 6 において、レーン M は分子量マーカを示し、レーン 1 はライゲーシオン前の mRNA を電気泳動したものを示し、レーン 2 はライゲーシオン産物を逆転写した産物を RNase H で処理した産物を電気泳動したものを示し、レーン 3 は、ライゲーシオン産物を逆転写した産物を電気泳動したものを示す。レーン 2 において、逆転写産物に対応するバンドが見られることから、逆転写反応が行なわれたことが確認された。

実施例 1-B : Thioredoxin mRNA に ligation された hybri spacer による in vitro virus virion 形成

Hybri spacer は実施例 1-A で用いた RT-thio の 3' 側にスペーサとして PEG (Polyethylene glycol) の誘導体及び dCdC-puromycin を化学的に連結したものであり、いわゆる in vitro virus のスペーサとして機能するものである。具体的な作製方法は、以下の通りである。

固相支持体の PuromycinCPG (GLEN RESEARCH) を出発物質とし、DNA 合成機上で d C d C、Spacer-18 (GLEN RESEARCH)、および Rt-thio の配列に相当するホスホアミダイトを順次連結し、脱保護と精製を行なった。この際、Spacer-18 の個数を変えることで、PEG の長さを変える。次に、通常の DNA 合成を行なうことで Hybri spacer が合成される。

#### (1) mRNA と Hybri spacer のライゲーシオン反応とその確認

上記した RT-thio プライマーを加工した Hybri spacer も実施例 1-A と同様の条件でライゲーシオン反応ができることを確かめるために、実施例 1-A と同様の操作に従ってライゲーシオン反応を行った。反応産物を電気泳動した結果を図 7 に示す。



図7において、左のレーンは分子量マーカを示し、真中のレーンは元のmRNAを泳動したものを示し、右のレーンはライゲーション産物を泳動したものを示す。変性条件下で電気泳動した場合で、ライゲーション産物の方が元のmRNAよりも分子量が大きくなっていることからライゲーション反応が行なわれていることが確認された。

このライゲーション反応産物を、RNeasy Mini (QIAGEN 社) を行って精製し、in vitro virus genome として用いた。

## (2) in vitro virus virion 形成の確認

in vitro virus virion の形成に関しては、スペーサ長の影響が大きいため、4種類の異なるPEG(具体的には、Spacer-18を5個、6個、7個又は8個連結した)をもつHybrid spacerを用意し、mRNAとHybrid spacerのライゲーション産物を(1)に基づいて調製した。

これらの各スペーサを付けたmRNA 1  $\mu$ gと1MBqの35S Met (Amersham 社)を小麦胚芽無細胞翻訳系に加え、30℃で45分間反応させ、最終濃度が20mM  $MgCl_2$ 、600mM KClになるように塩を加え、-20℃で一晩冷蔵した。次に翻訳産物に取り込まれないフリーの35SMetを取り除くために、Micro BioSpin Coloumn-6 (Biolad 社)を用いて精製後、EDTAを最終濃度100  $\mu$ Mになるように加えた。これによりmRNAを加えたままのリボソームは完全に離れ、mRNAとタンパク質が結合したin vitro virus virionのみが残る。

上記の通り精製した翻訳産物を15%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した結果を図8に示す。

図8において、レーン1は、スペーサーとしてspacer-18 (GLEN RESEARCH 社)が5個連結したものの、レーン2は6個、レーン3は7個、レーン4は8個連結したものを示す。

図8の結果から分かるように、spacer-18 (GLEN RESEARCH 社)が5個連結したスペーサを用いた場合(レーン1)が、最も効率良く連結していた。

## 実施例 1 - C : T-Spacer を用いた in vitro virus virion 形成と逆転写

### (1) T-Spacer の作製法

以下のような修飾 DNA を T-Spacer の原料として DNA 合成機で合成した。

DNA1 : (thiol) (Spc) (Spc) (Spc) (Spc) CC (ZFP)

DNA2 : (Pso) TACGCCAGCTGCACCCCCCGCCGCCCCCGC (At) CCGC

DNA3 : CCCGG (Ft) GCAGCTGGCGTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

DNA4 : CCCGGTGCAGCTGTTTCATC (Bt) CGGAAACAGCTGCACCCCCCGCCG

CCCCCGC (At) (Ft) (Spc) (Spc) (Spc) (Spc) CC (ZFP)

DNA5 : (thiol) CGCT

配列の中の (thiol) は 5' -Thiol-modifier C6、(Spc) は Spacer 18、(Bt) は Biotin-dT、(Ft) は Fluorescein-dT、(At) は Amino-modifier C6 dT、(Pso) は Psoralen C6 (以上すべてグレンリサーチ)、(ZFP) は Z-phenylalanyl-puromycin をそれぞれ示す。

### (A) T-splint3FA

DNA2 (12 nmol) と DNA3 (12 nmol) を TBS 緩衝液 (25 mM Tris-HCl、pH7.0、100 mM NaCl) 0.48 ml に溶かし、85°C で 40 秒加熱したのち室温で放冷した。氷浴上で 5 分放置したのちハンディ UV ランプ (365 nm) で 8 分間光照射し、反応生成物を逆相 HPLC で精製した。この DNA 4 nmol を 0.1 M リン酸水素 2 ナトリウム水溶液 15  $\mu$ l に溶かし、EMUS (架橋剤; 同仁化学) の 5 mM DMF 溶液 4  $\mu$ l を加えて 20 分室温で攪拌した。この溶液に DNA 1 (20nmol) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) 40  $\mu$ l に溶かした溶液を加え、さらに室温で 16 時間攪拌した。逆相高速液体クロマトグラフィ (逆相 HPLC) で架橋剤を介して結合した目的物を単離し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶かしてキモトリプシン溶液を基質に対して酵素の重量比が 10%程度になるように加えて 36°C で 1 時間放置した。逆相 HPLC で精製し、T-splint3FA を得た (図 4)。

### (B) T-splint4FB

DNA 4 (5 nmol) を 0.1 M リン酸水素 2 ナトリウム水溶液 15  $\mu$ l に溶かし、

Sulfo-KMUS（架橋剤；同仁化学）の 10 mM DMF 溶液 5  $\mu$ l を加えて 20 分室温で攪拌した。この溶液にさらに DNA 5（60 nmol）を 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.1）40  $\mu$ l に溶かした溶液を加え、さらに室温で 16 時間攪拌した。DNA4 と DNA5 が架橋剤を介して結合した目的物を逆相 HPLC で精製し、T-splint3FA と同様にキモトリプシンで消化を行なった。逆相 HPLC で再度精製し、T-splint4FB を得た（図 4）。

## （2）転写用 DNA の構築と mRNA の作製

転写効率の高い大腸菌ウィルス T7 の RNA polymerase によって認識される DNA 配列（T7 プロモーター配列）と翻訳の際に真核細胞のリボソームによって認識される DNA 配列（Kozak 配列）と原核細胞のリボソームによって認識される（シャイン・ダルガノ配列：Shine-Dalgarno）を有し、その下流に Oct-1 の一部（POU）と FLAG 配列、T-Spacer と連結するための配列（Y-tag）をコードした DNA（下記の配列番号 7）を構築した。

```
GATCCCGCGA AATTAATACG ACTCACTATA GGGAGACCAC AACGGTTTCC CTCTTGAAAT
AATTTTGTTC AACTTTAAGA AGGAGATTCC ACCATGGACC TTGAGGAGCT TGAGCAGTTT
GCCAAGACCT TCAAACAAAG ACGAATCAAA CTTGGATTCA CTCAGGGTGA TGTTGGGCTC
GCTATGGGGA AACTATATGG AAATGACTTC AGCCAAACTA CCATCTCTCG ATTTGAAGCC
TTGAACCTCA GCTTTAAGAA CATGGCTAAG TTGAAGCCAC TTTTAGAGAA GTGGCTAAAT
GATGCAGAGG GGGGAGGCAG CGATTACAAG GATGACGATG ACAAGGGCGG AAGCGGACGG
GGGGCGGCGG GAAA （配列番号 7）
```

作製した DNA を、反応液 100  $\mu$ l あたり 10  $\mu$ g を加え、RNA 合成キット Ribomax Large Scale RNA Production System（Promega）を使って mRNA に転写した。翻訳効率をあげるためにキャップアナログ（RNA Capping Analog；Gibco BRL）を最終濃度が 7.2mM になるように加え、mRNA の 5' 側を修飾した。キャップアナログおよび過剰の NTP（ヌクレオチド 3 リン酸）を除去するために、プライマー除去剤（Primer Remover；Edge Biosystems）を使ってエタノール沈澱を行った。

## （3）mRNA と T-Spacer（T-splint3FA）との ligation

上記（1）で作製した T-Spacer（T-splint3FA）と上記（2）で作製した mRNA

とのライゲーションは、実施例 1-A に記載の方法に準じて行なった。具体的には以下の通りである。

上記 (2) で作製した mRNA と上記 (1) で作製した T-Spacer (T-splint3FA) を 1 : 1.2-1.5 の割合 (モル比) で混合し、T4 RNA ligase buffer (50mM Tris-HCl、pH7.5、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、1mM ATP) に溶解し、特異性をあげるため変性剤として DMSO (Dimethyl sulfoxide) を最終濃度 5% になるように加えた。得られた混合物は、PCR 装置を用いて、94℃～25℃まで 10 分かけて冷却することによりアニーリングした。

続けて、上記のアニーリングした溶液中に T4 Polynucleotide Kinase (Takara) と T4 RNA ligase (Takara 製) を至適量加え、25℃で 30 分間反応させた。

反応後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 製) を使って、ライゲーション産物を精製した。ライゲーションの効率を確認するために、4% アクリルアミド 8M 尿素変性ゲル電気泳動、65℃、250V の条件でサンプルを泳動し、Vistra Green (Amersham pharmacia) で染色し、Molecular Imager (Bio Rad) で画像化した。また、スぺーサーに導入してある蛍光 (Fluorescein) についても確認した。結果を図 9 に示す。

図 9 において、レーン 1 は元の mRNA を泳動したものを示し、レーン 2 はライゲーション産物を泳動したものを示す。変性条件下で電気泳動した場合、ライゲーション産物の方が元の mRNA よりも分子量が大きくなっていることからライゲーション反応が行われていることが確認された。このライゲーション産物を *in vitro virus genome* と名付けた。

#### (4) T-Spacer (T-splint3FA) を用いた *in vitro virus virion* 形成

*in vitro virus genome* が、実際に *in vitro virus virion* を形成できるかどうか確認した。*in vitro virus genome* 4pmol を小麦胚芽無細胞翻訳系 PROTEIOS (TOYOBO) を用いて、26℃で 30 分間反応し翻訳させ、ピューロマイシンに翻訳されたペプチドを結合させる (virion 化) ために最終濃度が 40mM MgCl<sub>2</sub>、1M KCl になるように塩を加え、26℃で 1 時間反応させた。

Virion 化の効率を確認するために、5M 尿素変性 5% SDS-PAGE ゲル、20mA の条

件でサンプルを泳動した。T-Spacer に導入してある蛍光 (Fluorescein) を使って、Molecular Imager (Bio Rad) で画像化した。結果を図 10 に示す。

図 10 において、左のレーンは翻訳反応前のサンプルを泳動したものを示す。右のレーンはビリオン形成後のサンプルを泳動したものを示す。

#### (5) T-Spacer (T-splint3FA) を用いた逆転写反応の確認

in vitro virus genome が、実際に逆転写できるかどうかを確認した。2pmol の in vitro virus genome を TrueScript II Reverse Transcriptase (sawady) を用いて逆転写した。その後、半分を RNase H (Takara) 2units で分解し、逆転写した DNA があるかどうか確認した。4% アクリルアミド 8M 尿素変性ゲル電気泳動でサンプルを泳動し、Vistra Green (Amersham pharmacia 製) で染色し、Molecular Imager (Bio Rad) で画像化した。また、Spacer に導入してある蛍光 (Fluorescein) についても確認した。結果を図 11 に示す。

図 11 において、レーン 1 は、in vitro virus genome を泳動したものを示し、レーン 2 は、in vitro virus genome を逆転写した産物を泳動したものを示し、レーン 3 は、in vitro virus genome を逆転写した産物を RNase H で処理した産物を泳動したものを示す。逆転写産物に対応するバンドがみられることから、逆転写反応が行われたことが確認された。

#### (6) T-spacer (T-splint3FA) を用いた in vitro virus virion 形成後の逆転写反応の確認

in vitro virus virion を形成し、翻訳系より精製した後、T-spacer を用いて実際に逆転写できるかどうかを確認した。

8pmol の in vitro virus genome を上記の方法で virion 化し、buffer 交換をするために、Micro BioSpin Column-6 (Bio-Rad) を用いて脱塩後、1M NaCl、100mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA、0.25% Triton-X100 になるように調整し、Biotinylated Oligo(dT) Probe (Promega) を結合させた MAGNOTEX-SA (Takara) 5  $\mu$ l と 4℃、約 1 時間結合させる。その後、上清をとり、洗浄 bufferA (1M NaCl、100mM Tris-HCl (pH8.0)、0.25% Triton-X100) 20  $\mu$ l で 3 回洗い、bufferB (500mM

NaCl、100mM Tris-HCl (pH8.0)、0.25% Triton-X100) 20  $\mu$ l で 1 回洗い、bufferC(250mM NaCl、100mM Tris-HCl (pH8.0)、0.25% Triton-X100) 20  $\mu$ l で 1 回洗い、その後、Dep 水 10  $\mu$ l で 3 回溶出して in vitro virus が精製できるかどうか確認した。

次に、溶出画分の 1 と 2 をまぜ、TrueScript II Reverse Transcriptase (sawady)を用いて逆転写した。さらに、ネガティブコントロールとして in vitro virus genome、ポジティブコントロールとして in vitro virus genome を逆転写したもの (図 1 1) とともに、センスプライマー (配列番号 8) とアンチセンスプライマー (配列番号 9) をもちいて、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)を行った。DNA 合成酵素は、TaKaRa Ex Taq (TAKARA)を用いた。

結果を確認するために、6M 尿素変性 6%ポリアクリルアミドゲル、250V の条件でサンプルを泳動し、Vistra Green (Amersham pharmacia 製)で染色し、Molecular Imager (Bio Rad)で画像化した。結果を図 1 2 に示す。

図 1 2 において、レーン 1 は、in vitro virus genome、レーン 2 は、in vitro virus genome を逆転写したもの、レーン 3 は、ビリオン化後に精製して逆転写した in vitro virus を鋳型として PCR を行ったサンプルを泳動したものを示す。ビリオン化後に精製して逆転写した in vitro virus が、in vitro virus genome を逆転写したものを鋳型として PCR を行ったものと同様に、目的の DNA が増幅できていたことより、ビリオン化後に精製して in vitro virus が、T-sapcer をもちいて、逆転写できたことが確認された。

配列番号 8、5' -GTT TAA CTT TAA GAA GGA GTT GCC ACC ATG -3'

配列番号 9、5' -TTT CCC GCC GCC CCC CGT CCG CTT CCG CCC TTG TCA TCG TCA TCC TTG TAA TC -3'

実施例 2：

実施例 2-A：スペーサーの作製

以下のような修飾 DNA をスペーサーの原料として DNA 合成機で合成した。

DNA 1: (thiol) (Spc) (Spc) (Spc) (Spc) CC (ZFP)

DNA 2: CCCGGTGCAGCTGTTTCATC (Bt) CGGAAACAGCTGCACCCCCC (Ft) CCGCCCCCG (At) CCG  
C

DNA 3: (Pso) TACGCCAGCTGCACCCCCCGCCGCCCCCG (At) CCGC

DNA 4: CCCGG (Ft) GCAGCTGGCGTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

上記配列中の(thiol)、(Spc)、(Bt)、(Ft)、(At)及び(Pso)はユニットの略称であり、すべてグレンリサーチ社製の合成試薬を用いて配列中に導入した。これらユニットの略称、合成(導入)試薬の品名及びその化学名は、それぞれ次の通りである。

(thiol)

5'-Thiol-modifier C6

(S-Trityl-6-mercaptohexyl)-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite

(Spc)

Spacer Phosphoramidite 18

18-O-Dimethoxytritylhexaethyleneglycol, 1-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite

(Bt)

Biotin-dT

5'-Dimethoxytrityl-5-[N-((4-t-butylbenzoyl)-biotinyl)-aminohexyl]-3-acrylimido]-2'-deoxyUridine, 3'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite

(Ft)

Fluorescein-dT

5'-Dimethoxytrityl-5-[N-((3',6'-dipivaloylfluoresceinyl)-aminohexyl)-3-acrylimido]-2'-deoxyUridine, 3'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite

(At)

Amino-modifier C6 dT

5'-Dimethoxytrityl-5-[N-(trifluoroacetylaminohexyl)-3-acrylimido]-2'-deoxyUridine, 3'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite

(Pso)

Psoralen C6 Phosphoramidite

2-[4'-(hydroxymethyl)-4,5',8-trimethylpsoralen]-hexyl-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidite

また、(ZFP)はN- $\alpha$ -(N- $\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl)-puromycin 残基を示し、支持体 CPG に固定して DNA 合成機上で使えるようにしたものを特願 2002-044955 号明細書に記載の方法に準じて次の通り合成して配列の 3' 末端に導入した。

ピューロマイシン 2 塩酸塩 (和光純薬工業) 250 mg を水 3 ml に溶かし、ジメトキシエタン (DME) 2 ml、10%炭酸ナトリウム水溶液 0.5 ml を加えた。攪拌しながらこの溶液に Z-Phe-OSu (N- $\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-phenylalanine N-hydroxysuccinimide ester; BACHEM 社) 200 mg (1.1 当量) を DME 2 ml に溶かした溶液を加え、さらに 10%炭酸ナトリウム水溶液 0.5 ml を加えた。1 時間室温で攪拌したのち析出した固体をグラスフィルター上で濾取し、50%DME 水溶液 2 ml で 2 回、水 2 ml で 3 回、冷却した DME 2 ml で 2 回洗浄したのち真空ポンプで乾燥して N- $\alpha$ -(N- $\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl)-puromycin (ZF-puromycin) を 330 mg 得た。

ZF-puromycin 315 mg をピリジン 2.5 ml に溶かし、塩化ジメトキシトリチル 149 mg を加えて室温で 1 時間攪拌した。氷浴で冷却してから水 0.1 ml を加え、10 分攪拌したのち水と酢酸エチルで分液し、有機層を水で 3 回洗ってから濃縮し、真空ポンプで乾燥して粗 5'-dimethoxytrityl ZF-puromycin (DMTr-ZF-puromycin) を 450 mg 得た。

DMTr-ZF-puromycin 450 mg をピリジン 2 ml に溶かし、無水コハク酸 61 mg、ジ



メチルアミノピリジンの 0.5 M ピリジン溶液 40  $\mu$ l を加えて、窒素雰囲気下、室温で 3 日間撹拌した。氷浴で冷却してから水 0.1 ml を加え、10 分撹拌したのち水と酢酸エチルで分液し、有機層を水で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗ったのち濃縮した。酢酸エチルを展開溶媒としてシリカゲルクロマトグラフィで精製し、目的物である DMTr-ZF-puromycin-3'-succinate を 385 mg 得た。

DMTr-ZF-puromycin-3'-succinate 255 mg をジメチルホルムアミド (DMF) 0.4 ml に溶かし、ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) の 1.0 M DMF 溶液 0.2 ml と N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) の 0.5 M DMF 溶液 0.4 ml を加え、16 時間室温で撹拌した。この溶液に CPG (CPG LCA00500A ; 0.17 mmol/g) 500 mg を加えて 2 時間室温で撹拌し、さらに DIC の 1.0 M DMF 溶液 0.15 ml と HOBt の 0.5 M DMF 溶液 0.3 ml を加えて 16 時間室温で撹拌した。CPG をグラスフィルター上に濾取し、DMF、50% DMF 水溶液、アセトニトリルで洗ったのちポンプで乾燥した。全量を DMF 2 ml に懸濁させ、ピリジン 0.5 ml、無水酢酸 125 mg を加えて 1 時間室温で撹拌したのち CPG を濾取して DMF とアセトニトリルで洗浄した。真空ポンプで乾燥し、ZF-puromycin CPG を 520 mg 得た。一部を固相反応用の容器に入れ、トリクロロ酢酸の 3% 塩化メチレン溶液を加えて室温で 1 分撹拌し、アセトニトリルで洗浄したのち濃アンモニア水を加えて室温で 2 時間撹拌した。回収された ZF-puromycin を定量し、CPG 1 グラム当たり 28  $\mu$ mol と算出した。

#### (1) T-splint1FB

DNA 2 (4 nmol) を 0.1 M リン酸水素 2 ナトリウム水溶液 15  $\mu$ l に溶かし、N-(6-maleimidocaproyloxy)succinimide (EMCS) (架橋剤 ; 同仁化学製) の 5 mM DMF 溶液 4  $\mu$ l を加えて 20 分室温で撹拌した。この溶液に DNA 1 (20 nmol) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) 40  $\mu$ l に溶かした溶液を加え、さらに室温で 16 時間撹拌した。逆相高速液体クロマトグラフィ (逆相 HPLC) で DNA 1 と DNA 2 が架橋剤を介して結合した目的物を単離し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶かしてキモトリプシン溶液を基質に対して酵素の重量比が 10% 程度になるように加えて 36°C で 1 時間放置した。逆相 HPLC で精製し、T-splint1FB を得た。

(2) T-splint3FA

DNA 3 (12 nmol) と DNA 4 (12 nmol) を TBS 緩衝液 (25 mM Tris-HCl、pH7.0、100 mM NaCl) 0.48 ml に溶かし、85°C で 40 秒加熱したのち室温で放冷した。氷浴上で 5 分放置したのちハンディ UV ランプ (365 nm) で 8 分間光照射し、反応生成物を逆相 HPLC で精製した。これを T-splint1FB 調製の際と同様に EMCS で DNA 1 と架橋し、キモトリプシン処理ののち精製して T-splint3FA を得た。

## 実施例 2-B : 転写用 DNA の構築と mRNA の作製

転写効率の高い大腸菌ウイルス T7 の RNA polymerase によって認識される DNA 配列 (T7 プロモーター配列) と翻訳の際に真核細胞のリボソームによって認識される DNA 配列 (Kozak 配列) と原核細胞のリボソームによって認識される (シャイン・ダルガノ配列: Shine-Dalgarno) を有し、その下流に Oct-1 の一部 (POU ; 配列番号 1) と FLAG 配列、T-Spacer と連結するための配列 (Y-tag) をコードした DNA を構築した。

GATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTTGAAAT  
AATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATTCCACCATGGACCTTGAGGAGCTTGAGCAGTTT  
GCCAAGACCTTCAAAACAAAGACGAATCAAACCTGGATTCACTCAGGGTGATGTTGGGCTC  
GCTATGGGGAACTATATGGAAATGACTTCAGCCAACTACCATCTCTCGATTTGAAGCC  
TTGAACCTCAGCTTTAAGAACATGGCTAAGTTGAAGCCACTTTTAGAGAAGTGGCTAAAT  
GATGCAGAGGGGGGAGGCAGCGATTACAAGGATGACGATGACAAGGGCGGAAGCGGACGG  
GGGGCGGCGGGAAA (配列番号 7)

上記の方法で作製した DNA を、反応液 100  $\mu$ l あたり 10  $\mu$ g を加え、RNA 合成キット Ribomax Large Scale RNA Production System (Promega 製) を使って mRNA に転写した。翻訳効率をあげるためにキャップアナログ (RNA Capping Analog ; Gibco BRL 製) を最終濃度が 7.2mM になるように加え、mRNA の 5' 側を修飾した。キャップアナログおよび過剰の NTP (ヌクレオチド 3 リン酸) を除去するために、プライマー除去剤 (Primer Remover ; Edge Biosystems 製) を使ってエタノール

沈澱を行った。

#### 実施例 2-C : mRNA と T-スパーサーとのライゲーシオン

上記の実施例 2-A で作製した T-Spacer (T-splint3FA) と上記の実施例 2-B で作製した mRNA とのライゲーシオンは、特願 2002-012820 号明細書に記載の方法に準じて行なった。具体的には以下の通りである。

上記で作製した mRNA と T-spacer を 1 : 1.2 ~ 1.5 の割合 (モル比) で混合し、T4 RNA ligase buffer (50mM Tris-HCl、pH7.5、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、1mM ATP) に溶解し、特異性をあげるため変性剤として DMSO (Dimethyl sulfoxide) を最終濃度 5% になるように加えた。得られた混合物は、PCR 装置を用いて、94℃ ~ 25℃ まで 10 分かけて冷却することによりアニーリングした。

つづけて、上記のアニーリングした溶液中に T4 Polynucleotide Kinase (Takara 製) と T4 RNA ligase (Takara 製) を至適量加え、25℃ で 30 分間反応させた。

反応後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 製) を使って、ライゲーシオン産物を精製した。ライゲーシオンの効率を確認するために、4% アクリルアミド 8M 尿素変性ゲル電気泳動、65℃、250V の条件でサンプルを泳動し、Vistra Green (Amersham pharmacia 製) で染色し、Molecular Imager (Bio Rad) で画像化した。また、T-spacer に導入してある蛍光 (Fluorescein) についても確認した。この結果から、mRNA と T-spacer との結合率 (RNA-DNA 結合体の形成率) は 80 ~ 90% であることが確認された。

#### 実施例 2-D : T-スパーサーを用いた in vitro virus virion 形成

in vitro virus genome が、実際に in vitro virus virion を形成できるかどうか確認した。in vitro virus genome 4pmol を小麦胚芽無細胞翻訳系 PROTEIOS (TOYOBO 製) を用いて、26℃ で 30 分間反応し翻訳させ、ピューロマイシンに翻訳されたペプチドを結合させる (virion 化) ために最終濃度が 40mM MgCl<sub>2</sub>、1 M KCl になるように塩を加え、26℃ で 1 時間反応させた。

Virion 化の効率を確認するために、5M 尿素変性 5%SDS-PAGE ゲル、20mA の条件でサンプルを泳動した。

#### 実施例 2-E : T-スぺーサーを用いた in vitro virus の精製

in vitro virus virion を形成した後、T-spacer を用いて、実際に精製できるかどうかを確認した。

##### (1) ビオチン (T-splint1FB)

8pmol の in vitro virus genome を上記の方法で virion 化し、buffer 交換をするために、Micro BioSpin Column-6 (Bio-Rad 製) を用いて脱塩後、1M NaCl、100mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA、0.25% Triton-X100 になるように調整し、MAGNOTEX-SA (Takara 製) 5  $\mu$ l と 4°C、約 2 時間結合させる。その後、上清を取り、洗浄 buffer (1M NaCl、100mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA、0.25% Triton-X100) 20  $\mu$ l で 3 回洗い、その後、MAGNOTEX-SA を 2 つにわけ、一方を制限酵素 Pvu II (Takara 製) 37°C、約 1 時間処理し、その上清を得て、in vitro virus が精製できるかどうか確認した。

精製効率を確認するために、5M 尿素変性 5%SDS-PAGE ゲル、20mA の条件でサンプルを泳動した。スぺーサーに導入してある蛍光 (Fluorescein) を使って、Molecular Imager (Bio Rad 製) で画像化した。その結果を図 13 に示す。

図 13 において、レーン 1 は、virion 化し BioSpin Column-6 を用いて脱塩された in vitro virus を泳動したものを示し、レーン 2 は、MAGNOTEX-SA と結合させた後の上清を泳動したものを示し、レーン 3 ~ 5 は、上清を除いた後の MAGNOTEX-SA を洗浄したものを泳動し、レーン 6 は、洗浄した後の MAGNOTEX-SA を泳動し、レーン 7 は、洗浄した MAGNOTEX-SA を制限酵素で処理した後の上清を泳動し、レーン 8 は、MAGNOTEX-SA を制限酵素で処理した後の MAGNOTEX-SA を泳動したものを示す。洗浄した MAGNOTEX-SA を制限酵素で処理した後の上清に、in vitro virus が存在することから、T-splint スぺーサーを使って in vitro virus が精製できることが確認された。

(2) Poly A(T-splint3FA)

8pmol の in vitro virus genome を上記 (1) の方法で virion 化し、buffer 交換をするために、Micro BioSpin Column-6 (Bio-Rad 製) を用いて脱塩後、1M NaCl、100mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA、0.25% Triton-X100 になるように調整し、Biotinylated Oligo(dT) Probe (Promega 製) を結合させた MAGNOTEX-SA (Takara 製) 5  $\mu$ l と 4°C、約 1 時間結合させる。その後、上清をとり、洗浄 buffer A (1M NaCl、100mM Tris-HCl (pH8.0)、0.25% Triton-X100) 20  $\mu$ l で 3 回洗い、buffer B (500mM NaCl、100mM Tris-HCl (pH8.0)、0.25% Triton-X100) 20  $\mu$ l で 1 回洗い、buffer C (250mM NaCl、100 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.25% Triton-X100) 20  $\mu$ l で 1 回洗い、その後、Dep 水 10  $\mu$ l で 3 回溶出して in vitro virus virion が精製できるかどうか確認した。

精製効率を確認するために、5M 尿素変性 5%SDS-PAGE ゲル、20mA の条件でサンプルを泳動した。スパーサーに導入してある蛍光 (Fluorescein) を使って、Molecular Imager (Bio Rad 製) で画像化した。その結果を図 1 4 に示す。

図 1 4 において、レーン 1 は、virion 化し BioSpin Column-6 を用いて脱塩された in vitro virus genome を泳動したものを示し、レーン 2 は、Biotinylated Oligo(dT) Probe を結合させた MAGNOTEX-SA と結合しなかった上清を泳動したものを示し、レーン 3 ~ 7 は、上清を除いた後の Biotinylated Oligo(dT) Probe を結合させた MAGNOTEX-SA を洗浄したものを泳動し、レーン 8 ~ 1 0 は、洗浄した Biotinylated Oligo(dT) Probe を結合させた MAGNOTEX-SA を溶出したものを泳動し、レーン 1 1 は、溶出した後の Biotinylated Oligo(dT) Probe を結合させた MAGNOTEX-SA を泳動したものを示す。Biotinylated Oligo(dT) Probe を結合させた MAGNOTEX-SA を溶出したもの in vitro virus virion が存在することから、T-splint spacer を使って in vitro virus virion が精製できることが確認された。

実施例 3 : Pool (ネガティブコントロール/POU) からの protein A の B ドメイ

ンの選択

### (1) 転写用 DNA の構築

転写効率の高い大腸菌ウィルス T7 の RNA polymerase によって認識される DNA 配列 (T7 プロモーター配列) と翻訳の際に真核細胞のリボソームによって認識される DNA 配列 (Kozak 配列) と原核細胞のリボソームによって認識される (シャイン・ダルガノ配列: Shine-Dalgarno) を有し、その下流に Oct-1 の一部 (ネガティブコントロール/POU; 配列番号 7) あるいは protein A の B ドメイン (配列番号 10) と FLAG 配列、T-Spacer と連結するための配列 (Y-tag) をコードした DNA を構築した。

```
GATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTCCCTCTTGAAAT
AATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGTTGCCACCATGGATAACAAATTCAACAAAGAACAA
CAAAATGCTTTCTATGAAATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGCAATGGT
TTCATCCAAAGCCTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAA
AAGCTAAATGATGCTCAAGCACCAAAAGCTGACAACAAATTCAACGGGGGAGGCAGCGAT
TACAAGGATGACGATGACAAGGGCGGAAGCGGACGGGGGGCGGCGGGAAA
```

(配列番号 10)

### (2) mRNA の作成

上記 (1) で構築された DNA を実施例 2 に記載の方法に従って転写し、mRNA を調製した。

### (3) mRNA と T-スパーサーとのライゲーション

実施例 2-A で作成した T-Spacer (Tsplint3FA) と上記 (2) で作成した各 mRNA とを、実施例 2-C に記載の方法に従ってライゲーションし、in vitro virus genome を調製した。

### (4) in vitro virus virion 形成

実施例 2-D に記載の方法で、上記 (3) で調製した in vitro virus genome を用いて virion 形成をさせた。

Virion 形成させる際に、B ドメインと POU の in vitro virus genome を、1:1、

1:20、1:200 あるいは 1:200、1:20000、1:2000000、1:200000000 であわせて 8 pmol になるようにして翻訳させた。

#### (5) in vitro virus virion の精製

実施例 2-E (2) に記載の方法に準じて virion 精製を行った。

#### (6) 精製 in vitro virus virion の逆転写反応

上記 (5) で得られた in vitro virus 精製画分を用いて、実施例 1-C の (6) に記載の方法に準じて逆転写を行った。

#### (7) B ドメインの選択-1

逆転写反応したもの (それぞれ 40ul) を、final 50mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.25% Triton-X100、50  $\mu$ g/ml BSA、0.5  $\mu$ g/ml tRNA になるように調製した (total 50  $\mu$ l)。これを、10  $\mu$ g の抗 FLAG M2 抗体 (sigma 製) を結合させたプロテイン G セファロースビーズ 10  $\mu$ l (アマシャム・ファルマシア) に 4°C、1 時間結合させ、40  $\mu$ l の TBS で 3 回洗い、20  $\mu$ l の 0.1M Glycine-HCl (pH2.7) で 3 回溶出し、それぞれ 1M Tris (pH9.0) を 1  $\mu$ l 加えることによって、中性にし、in vitro virus virion を得た。

上記の溶出画分を集め、その 1/10 量 6  $\mu$ l を選択前のサンプルとした。残りの溶出画分を、final 50mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.25% Triton-X100、50  $\mu$ g/ml BSA、0.5  $\mu$ g/ml tRNA になるように調製した (total 60.9  $\mu$ l)。これを、IgG セファロースビーズ (Amersham pharmacia 製) に、4°C で 1 時間〜一晩結合させ、40  $\mu$ l の TBS で 3 回洗った。洗浄後のビーズを選択後のサンプルとした。

選択前、後のサンプルを RNase A 処理 (10unit RNase A (QIAGEN 製), 37°C, 30 分) し、次いで proteinase K 処理 (100  $\mu$ g/ml protease K (GIBCO 製), final 100mM KCl (pH8.0), 50mM EDTA, 500mM NaCl, 37°C, 30 分) し、エタノール沈澱後 PCR を行った。DNA 合成酵素は、TaKaRa Ex Taq (TAKARA 製) をもちいた。プライマーは、センス側: GTT TAA CTT TAA GAA GGA GTT GCC ACC ATG (配列番号 8)、アンチセンス側: TTT CCC GCC GCC CCC CGT CCG CTT CCG CCC TTG TCA TCG TCA TCC TTG TAA TC (配列番号 9) を用いた。

結果を確認するために、6M 尿素変性 4%ポリアクリルアミドゲル、250V の条件でサンプルを泳動し、Vistra Green (Amersham pharmacia 製) で染色し、Molecular Imager (Bio Rad 製) で画像化した。その結果を図 1 5 に示す。

バンドの定量は Molecular Imager (Bio Rad 製) で画像化したものを、解析ソフトを用いて数値化した。その結果を表 1 及び表 2 に示す。表中の値は、POU の量を 1 としたときの B ドメインの比である。なお、1:200 以上の割合で POU が存在している場合には、PCR のバンドとして B ドメインのバンドは検出できなかった。

表 1

1 <sup>st</sup> round					
B ドメイン : POU					
1:1		1:20		1:200	
選択前	選択後	選択前	選択後	選択前	選択後
1.08	4.55	0.24	1.59	0.1	0.54

表 2

B ドメイン : POU							
1:200		1:2 万		1:2 百万		1:2 億	
選択前	選択後	選択前	選択後	選択前	選択後	選択前	選択後
未検出	0.58	未検出	0.86	未検出	0.40	未検出	0.38

#### (8) B ドメインの選択－2

上記 (7) 1<sup>st</sup> round で選択、濃縮された B ドメインとネガティブコントロール (POU) DNA をもちいて、in vitro virus 用に再ライブラリー化し、さらに、B ドメインを次の通り選択した。

先ず、1<sup>st</sup> round で選択、濃縮された B ドメインとネガティブコントロール (POU) DNA をアガロースゲルで分離し、QIA quick gel extraction キット (QIAGEN 製)



で精製した。その DNA に 5' 非翻訳領域を連結させた。DNA 合成酵素は、TaKaRa Ex Taq (TAKARA 製) をもちいた。連結させた 5' 非翻訳領域の配列は次の通りである。

GCT CCG AGC TCA TTA ATA CGA CTC ACT

ATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTTGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGTTGCCACCATG

(配列番号 11)

転写以降は、1<sup>st</sup> round と同様に行った。その結果を図 16 に示す。

#### (9) 選択結果の評価

上記の通り、本実施例 3 においては、1<sup>st</sup> round で IgG と反応しない POU in vitro virus genome に、それぞれの割合いで結合する B ドメイン in vitro virus genome を混ぜて、ビリオン化以降の反応を共に行った。その際、in vitro virus genome を、計約 8pmol になるように調整して反応を行い、それぞれの過程を踏んだ後、IgG に結合させる前には in vitro virus virion としては 0.1 pmol 程度になっている。これを、1/10 量とっておき選択前のサンプルとした。残りの 9/10 を IgG カラムに結合させ、洗浄したあと残ったものを選択後のサンプルとした。それぞれについて PCR を行い、泳動したものを図 15 及び 16 に示した。

図 15 は、選択前と選択後の POU と B ドメインのバンドの濃さを示しているが、そのまま定量して B ドメインと POU が 1:20 や 1:200 になっているわけではない。検出されているバンドの比にから逆算して、初め 1:200 で混ぜたものが、選択後には 1:20 の選択前に近い比を示すので、10 倍濃縮されたというように考える。今回の結果から考えると、1:200 で始めたものは 100 倍濃縮されて 1:2 程度に、1:2 万ではじめたものは 1 万倍濃縮されて 1:2 程度に、1:200 万ではじめたものは 10 万倍濃縮されて 1:20 程度に、1:2 億ではじめたものは 1000 万倍濃縮されて 1:20 程度になる。

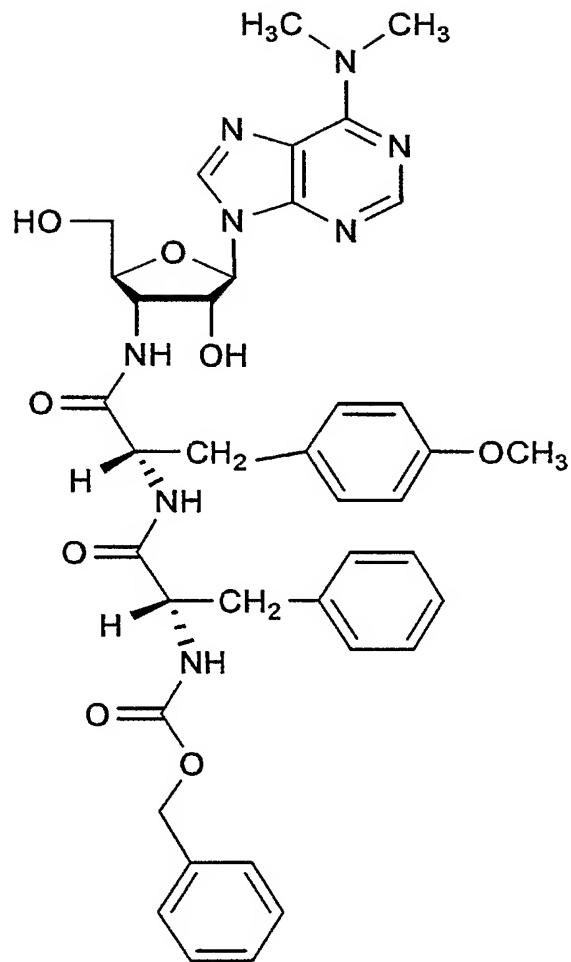
この選択後のものから in vitro virus virion を作製し、2<sup>nd</sup> round を行った。1<sup>st</sup> round でそれぞれ 1:2 から 1:20 まで濃縮されているので、1<sup>st</sup> round の 1:1 から 1:20 でみられた濃縮パターンと同じような結果が得られた (図 16)。

今回は、ライブラリーのサイズとして選択時に約  $1 \times 10^{11}$  の in vitro virus ビリ

オンを用いて行ったが、目的に合わせてサイズは増減できる。

実施例 4 :

(1) ピューロマイシン支持体 (ZF-Puromycin resin, ZF-Puromycin CPG) の合成  
ピューロマイシン 2 塩酸塩 (和光純薬工業) 250 mg を水 3 ml に溶かし、ジメトキシエタン (DME) 2 ml、10%炭酸ナトリウム水溶液 0.5 ml を加えた。攪拌しながらこの溶液に Z-Phe-OSu (BACHEM 社) 200 mg (1.1 当量) を DME 2 ml に溶かした溶液を加え、さらに 10%炭酸ナトリウム水溶液 0.5 ml を加えた。1 時間室温で攪拌したのち析出した固体をガラスフィルター上で濾取し、50%DME 水溶液 2 ml で 2 回、水 2 ml で 3 回、冷却した DME 2 ml で 2 回洗浄したのち真空ポンプで乾燥して  $N\alpha$ -( $N\alpha$ -ベンジルオキシカルボニルフェニルアラニル)-ピューロマイシン (ZF-puromycin) (構造を以下に示す) を得た。



収量 330 mg。

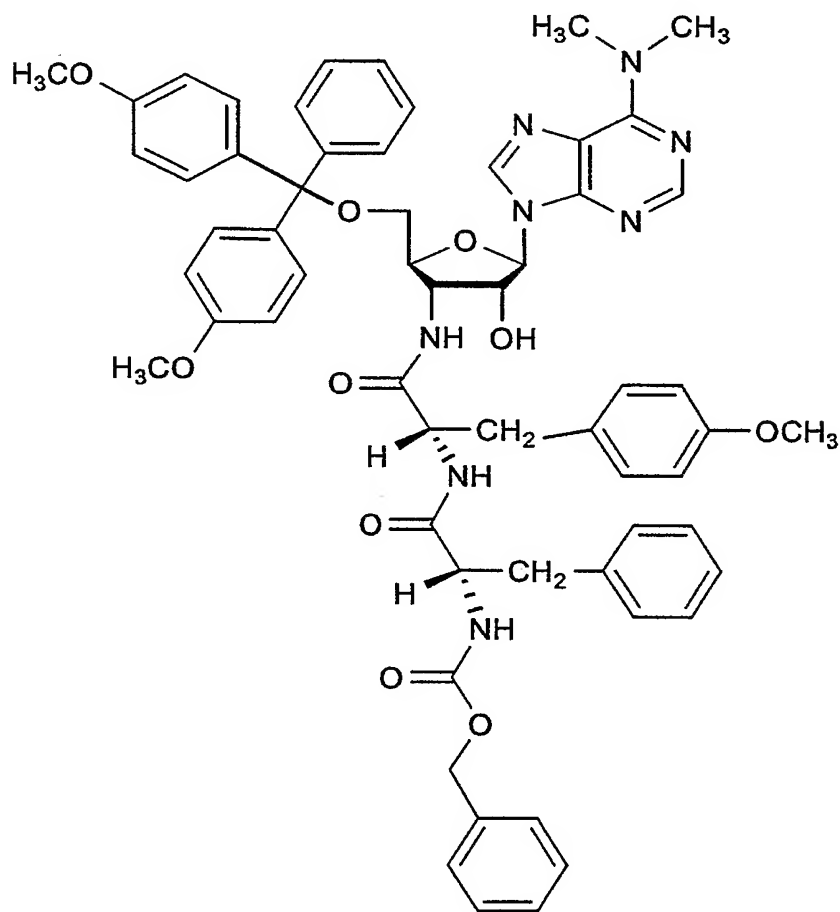
MS (MALDI-TOF-MS) 754.0 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) 8.46 (1H, s), 8.23 (1H, s), 8.15 (1H, d), 8.03 (1H, d), 7.50 (1H, d), 7.28 (2H, dd), 7.24-7.17 (10H, m), 6.82 (2H, d), 6.04 (br, 1H), 5.99 (d, 1H), 4.93 (d, 1H), 4.61 (dt, 1H), 4.49-4.44 (m, 2H), 4.22 (td, 1H), 3.94 (br, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.67 (s, 1H), 3.40 (br, 6H), 3.25 (dd, 2H), 2.93 (ddd, 2H), 2.80 (dd, 1H), 2.66 (dd, 1H)

ZF-puromycin の一部を 20%グリセロールを含む 25 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 中でキモトリプシン (重量比で 1/5) と共に 37℃で1時間インキュベートした。

生成物を逆相 HPLC と MALDI-TOF-MS で分析し、キモトリプシン処理により ZF-puromycin からピューロマイシンが得られていることを確認した。

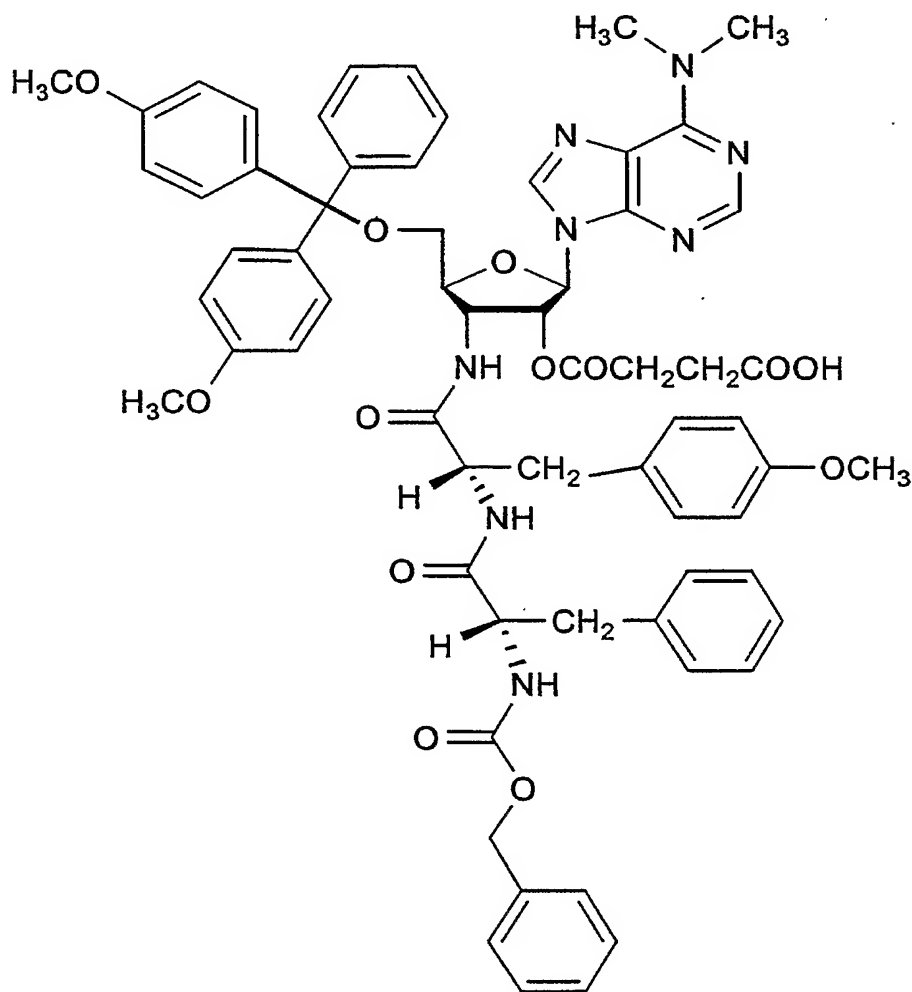
(MS 472.6 [M+H]<sup>+</sup>)

ZF-puromycin 315 mg をピリジン 2.5 ml に溶かし、塩化ジメトキシトリチル 149 mg を加えて室温で 1 時間攪拌した。氷浴で冷却してから水 0.1 ml を加え、10 分攪拌したのち水と酢酸エチルで分液し、有機層を水で 3 回洗ってから濃縮し、真空ポンプで乾燥して粗 5'-ジメトキシトリチル ZF-puromycin (DMTr-ZF-puromycin) (構造を以下に示す) を 450 mg 得た。



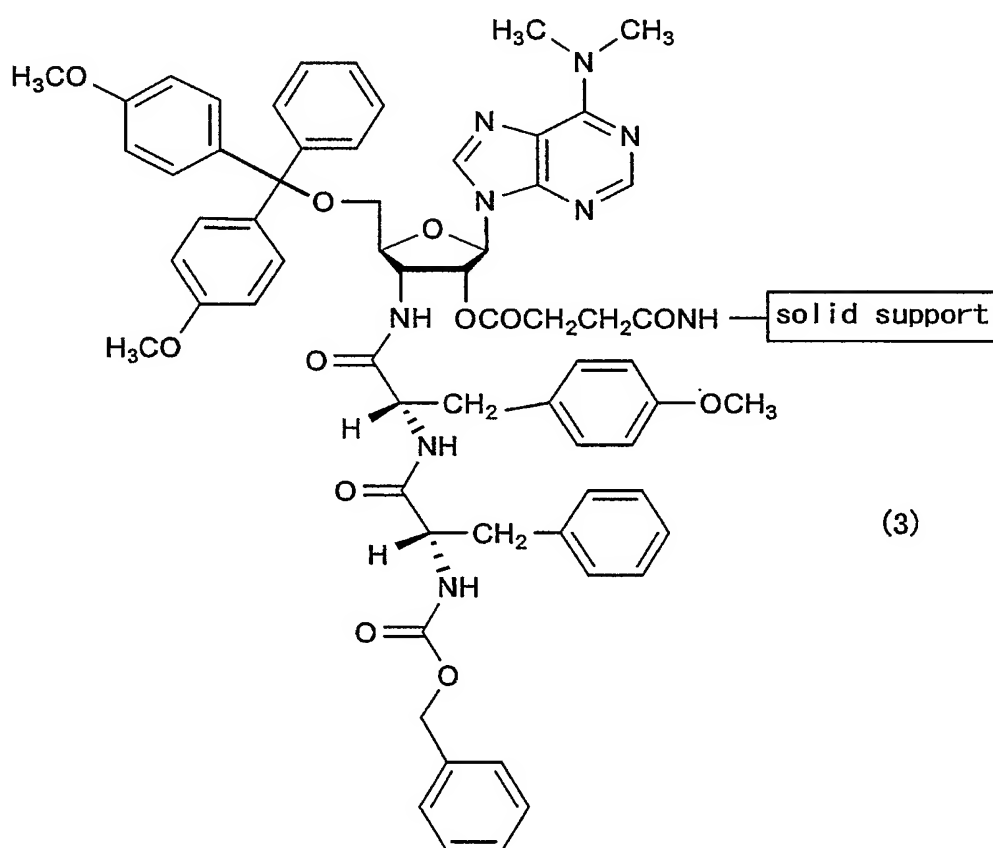
DMTr-ZF-puromycin 450 mg をピリジン 2 ml に溶かし、無水コハク酸 61 mg、ジメチルアミノピリジンの 0.5 M ピリジン溶液 40  $\mu$ l を加えて窒素雰囲気下室温で 3 日間攪拌した。氷浴で冷却してから水 0.1 ml を加え、10 分攪拌したのち水と酢

酸エチルで分液し、有機層を水で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗ったのち濃縮した。酢酸エチルを展開溶媒としてシリカゲルクロマトグラフィで精製し、目的物である DMTr-ZF-puromycin-3'-succinate (構造を以下に示す) を 385 mg 得た。



DMTr-ZF-puromycin-3'-succinate 255 mg をジメチルホルムアミド (DMF) 0.4 ml に溶かし、ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) の 1.0 M DMF 溶液 0.2 ml と N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) の 0.5 M DMF 溶液 0.4 ml を加え、16 時間室温で攪拌した。この溶液に NovaSyn TG amino resin (novabiochem ; 0.29 mmol/gram) 500 mg を加えて 2 時間室温で攪拌し、さらに DIC の 1.0 M DMF 溶液 0.15

ml と HOBt の 0.5 M DMF 溶液 0.3 ml を加えて 16 時間室温で撹拌した。レジンをガラスフィルター上に濾取し、DMF、50% DMF 水溶液、アセトニトリルで洗ったのちポンプで乾燥した。全量を DMF 2 ml に懸濁させ、ピリジン 0.5 ml、無水酢酸 125 mg を加えて 1 時間室温で撹拌したのちレジンを濾取して DMF とアセトニトリルで洗浄した。真空ポンプで乾燥し、式 (3) の構造を有する ZF-puromycin resin 550 mg を得た。但し、式 (3) において、solid support は NovaSyn TG amino resin を示す。



一部を固相反応用の容器に入れ、トリクロロ酢酸の 3%塩化メチレン溶液を加えて室温で 1 分撹拌し、アセトニトリルで洗浄したのち濃アンモニア水を加えて室温で 2 時間撹拌した。回収された ZF-puromycin を定量し、レジン 1 グラム当たり 45  $\mu\text{mol}$  と算出した。

NovaSyn TG amino resin の代わりに CPG (CPG LCA00500A ; 0.17 mmol/gram) を

用いて同様の反応を行ない、DNA 合成機用の式 (3) の構造を有する ZF-puromycin CPG ( $28 \mu\text{mol}/\text{gram}$ ) を得た。但し、式 (3) において、solid support は CPG を示す。

## (2) ZF-puromycin CPG を用いたスパーサーの合成

ZF-puromycin CPG 28 mg ( $0.8 \mu\text{mol}$  相当) を合成カラム (グレンリサーチ 20-0030-00) に詰めて合成機にセットし、以下のような配列の修飾 DNA の合成を  $1 \mu\text{mol}$  スケールで行なった。配列の中の (At) は Amino modifier C6 dT、(Ft) は Fluorescein dT、(Spc) は Spacer 18 (以上すべてグレンリサーチ)、(ZFP) は ZF-puromycin をそれぞれ示す。

5' -CGGAAACAGCTGCACCCCCCGCCGCCCCCG (At)

(Ft) (Spc) (Spc) (Spc) (Spc) CC (ZFP) -3'

逆相 HPLC による精製のあと  $35 \text{ nmol}$  の目的物が得られた。

このうち  $5 \text{ nmol}$  を  $0.1 \text{ M}$  リン酸水素 2 ナトリウム水溶液  $15 \mu\text{l}$  に溶かし、Sulfo-KMUS (架橋剤; 同仁化学) の  $10 \text{ mM}$  DMF 溶液  $5 \mu\text{l}$  を加えて 20 分室温で撹拌した。逆相 HPLC で架橋剤と反応した DNA のフラクションを集め、溶液状態のまま 5'-(thiol)-CGCT-3' (5' 末端がチオール修飾されたテトラヌクレオチド)  $20 \text{ nmol}$  と混合して濃縮し、さらに  $0.1 \text{ M}$  リン酸緩衝液 (pH 7.1)  $100 \text{ ml}$  を加えて室温で 16 時間撹拌した。架橋剤を介してテトラヌクレオチドが (At) 部分に結合したと考えられる生成物を逆相 HPLC で精製し、 $50 \text{ mM}$  リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶かしてキモトリプシン溶液を基質に対して酵素の重量比が 10% 程度になるように加えて  $36^\circ\text{C}$  で 1 時間放置した。逆相 HPLC で目的物であるスパーサーを精製した。

上記で得られたスパーサーを、原料の DNA を同様にキモトリプシンで消化したものと共にポリアクリルアミドゲル (15%) で電気泳動し、スパーサー (左のレーン) が遅く泳動されていることを確認した (図 17)。

実施例 5 : 変異体 Pou-specific domain に提示したランダムペプチドライブラリ

# 一からの糖鎖結合ペプチドの取得

糖鎖の 1 種である N-アセチルグルコサミンにカルシウム存在下で結合するペプチド (12 残基) が天然のレクチンタンパク質から得られている (Yamamoto, K., et al. (1992) J. Biochem. 111 436-439)。そこでこの中の 5 残基をランダムな配列にし、これを変異体 Pou-specific domain (配列番号 21) の N 末端側に融合させてカルシウム存在下で糖鎖に結合するペプチドをスクリーニングできるかどうかを調べた。本実施例の概念の模式図を図 19 に示す。

まず、ペプチドを提示する支持体である変異体 Pou-specific domain DNA を作成するために次のような手順で行った。

T7 プロモーターと Kozac 配列をもつ DNA "T7-Kozac" (配列番号 13; gctccgagct cattaatac g actcactata gggagaccac aacggtttcc ctcttgaaat aattttgttt aactttaaga aggagttgcc accatg) とランダム配列をもつ DNA "Lec-random" (配列番号 14 : gctcaagctc ctcaaggctc ccaccgcctc cggaagggtc zyxzyxzyxz yxzyxgaagg tgtcaaattc aacgtcagtc aggtgaataa ttttatcgct catggtggca tctccttctt 120) と支持体のコンスタントな配列を持つ DNA "Pou" (配列番号 15 : gaccttgagg agcttgagca gtttgccaag acctcaaac aaagacgaat caaacttgga ttcactcagg gtgatgttgg gctcgctatg gggaaactat atggaaatga cttcagccaa actaccatct ctcgatttga agccttgaac ctcagcttta agaacatggc taagttgaag ccacttttag agaagtggct aaatgatgca gaggggggag gcagctctag agctg) を有機合成した。なお、配列番号 14 において、X, Y, Z の各塩基の組成は以下の通りである。これは 20 種類のアミノ酸が均等に出現し、かつ終止コドンが少ないように理論計算したものである。

X : A (35%), T (13%), G (32%), C (20%)

Y : A (30%), T (24%), G (24%), C (22%)

Z : A (0%), T (37%), G (26%), C (37%)

配列番号 15 の Pou は ttgagcttga ggcagcacc ttgaggagctt gagca (配列番号 16) 及び gaggacgggg ggcggcgggg ggcagctcta gagctgcctc cccc (配列番号 17) を



プライマーとしてポリメレース連鎖反応 (PCR) を行い2本鎖化した (図20)。

#### (1) T7-Kozac と Lec-random の連結

T7-Kozac と Lec-random を連結させるために、プライマーを使わず各々 1 pmol を以下の条件で伸長反応サイクルを行った。Taq polymerase は EX Taq. (Takara) を 2 units 用い、反応条件は、95℃で30秒、64℃で20秒、72℃で20秒のサイクルを25回くり返す。連結産物“T7-Lec-random”は8M 尿素変性アクリルアミド電気泳動で解析した (図21)。この結果、ほとんど全て連結されたことが確認できた。

#### (2) T7-Lec-random と Pou の連結

上記(1)で連結した T7-Lec-random と Pou を連結するために、プライマーを使わず各々 10 pmol を以下の条件で伸長反応サイクルを行った。Taq polymerase は KOD Dash. (TOYOBO) を 1.25units 用い、反応条件は、95℃で30秒、54℃で2秒、74℃30秒のサイクルを25回くり返す。連結産物“T7-Lec-random-Pou”は8M尿素変性アクリルアミド電気泳動で解析した (図22)。この結果、T7-Lec-random-Pou が連結されたことが確認でき、また、T7-Lec-random と Pou の連結されない側の1本鎖DNAも確認された。

#### (3) T7-Lec-random-Pou の転写

上記(2)で連結した産物をフェノール処理し、PrimerRemover (Edge System Science) を用いて精製した。分光計を用いてDNAのモル濃度を測定し、2.5 μg を RiboMax T7 転写キット (Promega) の反応組成に最終体積50 μl になるように加え、37℃で1時間反応させた。次にこの反応液に RQ1 Rnase-free DNase (Promega) を 2.5 units 加え、37℃で15分反応した。これをフェノール抽出し、PrimerRemover で精製した。これを8M尿素変性アクリルアミド電気泳動で解析した。結果を図23に示す。図23の結果から、連結されたDNAからのRNAが主バンドとして転写されたことがわかった。

このように作成したランダムな5残基を含むレクチン様ペプチドの配列と支持体タンパク質 Pou-specific domain をコードしたmRNAは in vitro virus 用ス

ペーサ (DNA-PEG-Puromycin) と 50℃ から 20℃ になるまで 15 分ほどかけて冷やした後、T4 RNA ligase (Takara) を加え 25℃ で 20 分反応させ連結した。

in vitro virus 用スぺーサは、ピューロマイシンが固定されたレジン Puromycin CPG (GLEN RESEARCH: 20-4040-01) から 5' 側に向けて、スぺーサホスホアミダイト 18 (GLEN RESEARCH: 10-1918-90) を 3 ユニット合成し、Amino-Modifier C6-dT (GLEN RESEARCH: 10-1039-90) を続けて結合、その後、通常の DNA 合成試薬を用いて、DNA 合成 (ccccccgccg cccccgtcc tc ; 配列番号 18) を行った。

これを RNA 精製カラム (QIAGEN) で精製後、小麦胚芽系の無細胞翻訳系を用いて、in vitro virus virion (mRNA とタンパク質が結合したもの) を作成、カルシウム存在下、バッファー A (Tris-HCl 10mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 25 mM, pH 6.8) で N-アセチルグルコサミンを固定したアビジンビーズ (EY Laboratories) と混ぜ、室温で 1 時間インキュベーションした。次にバッファー A で 4 回洗浄後、カルシウムを除いたバッファー B (Tris-HCl 10mM, NaCl 150 mM, EDTA 2.5 mM, pH 6.8) で溶出した。バッファー A で 4 回洗浄すると溶出される in vitro virus virion はほとんどなくなるが、カルシウムのないバッファー B で洗浄すると in vitro virus virion が再び溶出されることから、in vitro virus virion に提示されていたペプチドはカルシウムに依存してこの糖鎖に結合するペプチドであることがわかる (図 24)。

溶出された in vitro virus virion の mRNA は逆転写プライマー (gtcctctagagctgcc ; 配列番号 7) を用いて、TrueScript II Reverse Transcriptase (サワデュー) で以下の条件で逆転写した。反応は 20 μl スケール。90℃ で 2 分、75℃ から 25℃ へ -0.055℃/秒で冷却、25℃ で 2 分。ここで、逆転写酵素、Rnase Inhibitor を加え、50℃ で 1 時間反応を行った。

その後、この反応液を 1 μl 取りプライマー (gatcccgcca aattaatacgaactcactata ggg ; 配列番号 20) と (gaggacgggg ggcggcgggg ggcagctctagagctgcctc cccc ; 配列番号 17) を用いて Extaq Polymerase (Takara) で以下の条件で PCR した。95℃ で 30 秒、64℃ で 20 秒、72℃ で 20 秒のサイ

クルを20回。

また、取得された配列をシーケンスした結果、最初のライブラリーに比べ水素結合しやすい側鎖を多く持つペプチドが得られてきた(図25)。このことから、この変異体 Pou-specific domain は機能ペプチドを提示する支持体タンパク質として有用であることがわかった。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、短時間に効率よくRNA-DNA結合体を製造する方法を提供することが可能になった。さらに本発明により、タンパク質とRNAの複合体を効率よく製造することが可能になった。即ち、本発明の方法により、従来の方法では製造の効率が悪かった in vitro virus genome を短時間に90%以上の効率で合成することが可能になり、さらにこのRNA-DNA結合体を無細胞翻訳系で翻訳することにより、タンパク質とRNAの結合効率も10倍以上向上させることが可能になった。また、RNAの逆転写のためのプライマー配列をDNAに付加させることにより、そのまま逆転写することが可能になり、タンパク質とDNAの複合体とすることで安定化することも可能である。本発明の方法は、進化分子工学における様々な新機能タンパク質の取得や、ポストゲノムにおけるタンパク質の相互作用解析に幅広く利用可能である。

また、本発明の T-Spacer は、mRNA とライゲーシオンすることにより、in vitro virus genome を構築することができ、さらにこれを翻訳することで in vitro virus virion を容易に作製することができる。また、本発明の T-Spacer には、mRNA の逆転写のためのプライマーとして作用する DNA 配列を有していることから、上記で得られた in vitro virus virion を逆転写反応に付することにより、mRNA を DNA に転換することができる。また、本発明の T-Spacer は親和性物質を有することにより、mRNA 側で in vitro virus virion の精製を行なうことができるだけでなく、mRNA を支持体に固定化してプロテインチップ作成する際においても有用である。さらに、本発明の T-Spacer を用いて製造された RNA-タンパク質複合体及びD

NA-タンパク質複合体は、核酸の機能の解析などにおいて有用な材料となり得るものである。

さらに本発明によれば、上記した特長を有する T-Spacer を用いて製造された核酸-タンパク質複合体 (in vitro virus virion) を用いて、所望の機能を (生物活性) を有するタンパク質および/または核酸の効率的な選択、相互作用の検出や機能の解析などが可能となる。

さらに本発明によれば、ピューロマイシンの  $\alpha$ -アミノ基が酵素的に脱保護されるようにアミノ酸誘導体で保護した新規ピューロマイシン誘導体を提供することが可能になった。

さらに本発明によれば、比較的短いペプチドは無細胞翻訳系で発現させることを可能とする支持体タンパク質を提供することが可能になった。

さらに本発明によれば、ランダムな配列を含むDNAをその多様性を損なわずに支持体タンパク質等のコードされた定型配列DNAに連結し、続けてRNAに転写できることがわかった。これは in vitro virus 法のような in vitro でタンパク質のスクリーニングをする場合、極めて重要な方法である。

## 請求の範囲

1. (1) 互いに相補的な配列を有する一本鎖RNAと一本鎖DNA又はその誘導体とをアニーリングさせる工程；及び  
(2) アニーリング産物をRNAリガーゼで処理して、一本鎖RNAの3'末端と一本鎖DNA又はその誘導体の5'末端とを連結する工程；  
を含むRNA-DNA結合体の製造方法。
2. (1) 蛋白質をコードするコード配列を含み、3'末端側に5'から3'方向にアニーリング配列とブランチ配列とを有する一本鎖RNAと、3'から5'方向に上記アニーリング配列と相補的な配列とブランチ配列とを有する一本鎖DNA又はその誘導体とをアニーリングする工程；及び  
(2) アニーリング産物をRNAリガーゼで処理して、一本鎖RNAの3'末端と一本鎖DNA又はその誘導体の5'末端とを連結する工程；  
を含むRNA-DNA結合体の製造方法。
3. 一本鎖RNAがmRNA又はmRNAライブラリーである、請求項1又は2に記載の方法。
4. 一本鎖RNAが、(1) プロモーター配列、(2) 翻訳の際にリボソームによって認識される塩基配列、及び(3) 目的タンパク質をコードする配列を有することを特徴とする、請求項1から3の何れかに記載の方法。
5. 目的タンパク質が、目的ペプチド又は目的タンパク質と、30から200アミノ酸残基からなる球状タンパク質から成ることを特徴とする目的ペプチド又は目的タンパク質を融合タンパク質として発現及び提示するための支持体タンパク質とから成る融合タンパク質である、請求項1から4の何れかに記載の方法。
6. 一本鎖DNA又はその誘導体として、3'末端に核酸誘導体が結合している一本鎖DNAの誘導体を使用する、請求項1から5の何れかに記載の方法。
7. 一本鎖DNA又はその誘導体として、3'末端に核酸誘導体がスペーサーを介して結合している一本鎖DNAの誘導体を使用する、請求項1から6の何

れかに記載の方法。

8. 一本鎖DNA又はその誘導体として、3'末端に、一本鎖RNAの逆転写の際にプライマーとして作用する配列を有する一本鎖DNAの誘導体を使用する、請求項1から6の何れかに記載の方法。

9. 一本鎖DNA又はその誘導体として、3'末端に、該一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列を有し、かつ核酸誘導体を末端に有するスペーサーが枝分かれした状態で結合している一本鎖DNAの誘導体を使用する、請求項1から5の何れかに記載の方法。

10. 核酸誘導体が、ピューロマイシン、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド、3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシドの化学構造骨格を含む化合物又はそれらの類縁体である、請求項5から9の何れかに記載の方法。

11. スペーサーがポリエチレン又はポリエチレングリコールなどの高分子である、請求項7から10の何れかに記載の方法。

12. RNAリガーゼがT4RNAリガーゼである、請求項1から11の何れかに記載の方法。

13. 請求項1から12の何れかに記載の方法により得られるRNA-DNA結合体。

14. 請求項1から12の何れかに記載の方法により得られるRNA-DNA結合体を逆転写反応に付してDNA結合体を製造する方法。

15. 請求項1から12の何れかに記載の方法により得られるRNA-DNA結合体をタンパク質翻訳系に導入してRNAをタンパク質に翻訳することを特徴とする、RNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成るRNA-タンパク質複合体の製造方法。

16. 請求項15に記載の製造方法により製造されるRNA-タンパク質複合体。

17. 請求項16に記載のRNA-タンパク質複合体を逆転写反応に付する

ことを特徴とする、DNAと該DNAによりコードされるタンパク質から成る核酸-タンパク質複合体の製造方法。

18. 請求項17に記載の製造方法により製造される核酸-タンパク質複合体。

19. 一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列を3'末端側に含み、該一本鎖DNA配列が、その3'末端に、該一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列を有し、かつ核酸誘導体を末端に有するスペーサーが枝分かれした状態で結合しており、該一本鎖DNA配列の5'末端側に親和性物質が結合している、一本鎖RNAとそれがコードするタンパク質との複合体を作製するための核酸構築物。

20. 該一本鎖DNA配列の5'末端側に制限酵素認識部位が存在する、請求項19に記載の核酸構築物。

21. 一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列を3'末端側に含む、一本鎖RNAとそれがコードするタンパク質との複合体を作製するための核酸構築物において、

(1) 該一本鎖DNA配列が、その3'末端に、該一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列を有し、かつ核酸誘導体を末端に有するスペーサーが枝分かれした状態で結合しており、

(2) 該核酸構築物において該一本鎖RNAとアニーリングしない5'末端側は、ループ領域を介して互いに相補的な二本鎖配列を形成しており、

(3) 該ループ領域に親和性物質が結合している、  
ことを特徴とする上記の核酸構築物。

22. 一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列を3'末端側に含む、一本鎖RNAとそれがコードするタンパク質との複合体を作製するための核酸構築物において、

(1) 該一本鎖DNA配列が、その3'末端に、該一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列を有し、かつ核酸誘導体を末端に有するスペーサーが枝分かれ

した状態で結合しており、

(2) 該核酸構築物において該一本鎖RNAとアニーリングしない5'末端側は、相補DNA鎖と化学的に結合して互いに相補的な二本鎖配列を形成しており、

(3) 該相補DNA鎖の3'末端に親和性物質が結合している、  
ことを特徴とする上記の核酸構築物。

23. 該二本鎖配列中に制限酵素認識部位が存在する、請求項21又は22に記載の核酸構築物。

24. 核酸誘導体が、ピューロマイシン、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド、3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシドの化学構造骨格を含む化合物又はそれらの類縁体である、請求項19から23の何れかに記載の核酸構築物。

25. スペーサーがポリエチレン又はポリエチレングリコールなどの高分子である、請求項19から24の何れかに記載の核酸構築物。

26. 親和性物質がビオチン又はポリA配列である、請求項19から25の何れかに記載の核酸構築物。

27. 請求項19から26の何れかに記載の核酸構築物と一本鎖RNAとをアニーリングさせ、該核酸構築物の二本鎖領域の5'末端と一本鎖RNAの3'末端とをライゲーションさせることを含む、RNA-DNA結合体の作製方法。

28. ライゲーションをT4RNAリガーゼを用いて行なう、請求項27に記載の方法。

29. 一本鎖RNAがmRNA又はmRNAライブラリーである、請求項27又は28に記載の方法。

30. 一本鎖RNAが、(1) プロモーター配列、(2) 翻訳の際にリボソームによって認識される塩基配列、及び(3) 目的タンパク質をコードする配列を有することを特徴とする、請求項27から29の何れかに記載の方法。

31. 目的タンパク質が、目的ペプチド又は目的タンパク質と、30から200アミノ酸残基からなる球状タンパク質から成ることを特徴とする目的ペプチ



ド又は目的タンパク質を融合タンパク質として発現及び提示するための支持体タンパク質とから成る融合タンパク質である、請求項 27 から 30 の何れかに記載の方法。

32. 請求項 27 から 31 の何れかに記載の方法により得られる RNA-DNA 結合体。

33. 請求項 32 に記載の RNA-DNA 結合体を支持体上に固定化したチップ。

34. 請求項 27 から 31 の何れかに記載の方法により得られる RNA-DNA 結合体を逆転写反応に付して DNA 結合体を製造する方法。

35. 請求項 27 から 31 の何れかに記載の方法により得られる RNA-DNA 結合体を逆転写反応に付することにより得られる DNA 結合体。

36. 請求項 35 に記載の DNA 結合体を支持体上に固定化したチップ。

37. 請求項 32 に記載の RNA-DNA 結合体をタンパク質翻訳系に導入して RNA をタンパク質に翻訳することを特徴とする、RNA と該 RNA によりコードされるタンパク質から成る RNA-タンパク質複合体の製造方法。

38. 翻訳を無細胞翻訳系で行なう、請求項 37 に記載の作製方法。

39. 請求項 32 に記載の RNA-DNA 結合体をタンパク質翻訳系に導入して RNA をタンパク質に翻訳することにより得られる、RNA と該 RNA によりコードされるタンパク質から成る RNA-タンパク質複合体。

40. 請求項 39 に記載の RNA-タンパク質複合体を支持体上に固定化したチップ。

41. 請求項 39 に記載の RNA-タンパク質複合体を逆転写反応に付することを特徴とする、核酸と該核酸によりコードされるタンパク質から成る核酸-タンパク質複合体の製造方法。

42. 請求項 39 に記載の RNA-タンパク質複合体を逆転写反応に付することにより得られる核酸-タンパク質複合体。

43. 請求項 42 に記載の核酸-タンパク質複合体を支持体上に固定化した

チップ。

44. (1) 請求項13または32に記載のRNA-DNA結合体を調製する調製工程、(2)調製工程で得られたRNA-DNA結合体をタンパク質翻訳系に導入してRNAをタンパク質に翻訳させてRNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成るRNA-タンパク質複合体を構築する構築工程、(3)構築工程で得られたRNA-タンパク質複合体を被験物質との相互作用に基づいて選抜する選抜工程、および、(5)選抜工程で選択されたRNA-タンパク質複合体の核酸部分を増幅する増幅工程とを含むことを特徴とする核酸および／またはタンパク質の選択方法。

45. 増幅工程で得られた核酸を、一本鎖RNAとしてRNA-DNA結合体を調製する調製工程に供し、(1)調製工程、(2)構築工程、(3)選抜工程、および、(5)増幅工程を繰り返し行うことを特徴とする請求項44に記載の方法。

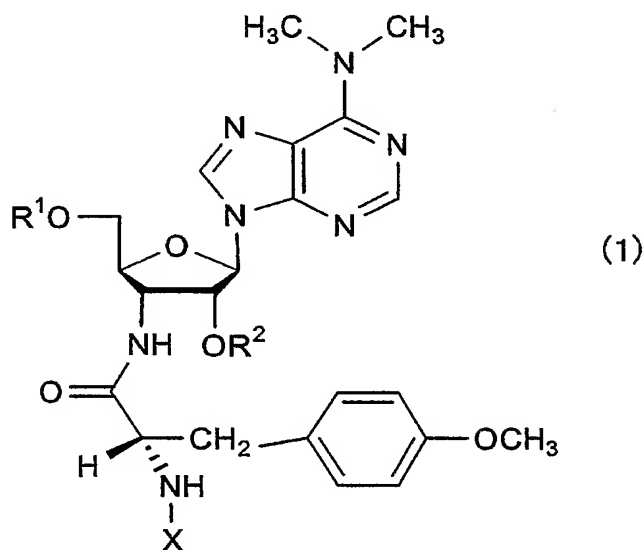
46. (1) (a) 一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができ一本鎖DNA配列を3'末端側に含む核酸構築物を調製し、(b) 該核酸構築物と一本鎖RNAとをアニーリングさせ、(c) 該アニーリング産物の一本鎖RNAの3'末端と核酸構築物の5'末端とを連結させてRNA-DNA結合体を調製する調製工程、(2)調製工程で得られたRNA-DNA結合体をタンパク質翻訳系に導入してRNAをタンパク質に翻訳させてRNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成るRNA-タンパク質複合体を構築する構築工程、(3)構築工程で得られたRNA-タンパク質複合体を被験物質との相互作用に基づいて選抜する選抜工程、(4)選抜工程で選択されたRNA-タンパク質複合体の核酸部分に変異を導入する変異導入工程、および、(5)変異導入工程で得られた核酸部分を増幅する増幅工程とを含むことを特徴とする核酸および／またはタンパク質の選択方法。

47. 増幅工程で得られた核酸を、一本鎖RNAとしてRNA-DNA結合体を調製する調製工程に供し、(1)調製工程、(2)構築工程、(3)選抜工

程、(4) 変異導入工程、および、(5) 増幅工程を繰り返し行うことを特徴とする、請求項46に記載の方法。

48. (1) (a) 一本鎖RNAの3'末端側の配列とアニーリングすることができる一本鎖DNA配列を3'末端側に含む核酸構築物を調製し、(b) 該核酸構築物と一本鎖RNAとをアニーリングさせ、(c) 該アニーリング産物の一本鎖RNAの3'末端と核酸構築物の5'末端とを連結させてRNA-DNA結合体を調製する調製工程、(2) 該RNA-DNA結合体をタンパク質翻訳系に導入してRNAをタンパク質に翻訳させてRNAと該RNAによりコードされるタンパク質から成る核酸-タンパク質複合体を構築する構築工程、および、(6) 構築工程で得られた核酸-タンパク質複合体と被験物質との相互作用を調べる検定工程とを含むことを特徴とするタンパク質と被験物質との相互作用の検出方法。

49. 下記式(1)で表されるピューロマイシン誘導体又はその塩。



(式中、 $R^1$ は水素原子、又は水酸基の保護基を示し；

$R^2$ は水素原子又は反応性基を示し；

Xはアミノ酸残基あるいはペプチドを示し、Xにおいて、そのカルボキシル基がピューロマイシン中のアミノ基とアミド結合により結合しており、該アミノ酸残基

あるいはペプチドの $\alpha$ アミノ基および側鎖の官能基は所望により保護されていてもよい。)

50. アミノ酸残基あるいはペプチドが芳香族アミノ酸残基である、請求項49に記載のピューロマイシン誘導体又はその塩。

51. 該芳香族アミノ酸残基がフェニルアラニン残基である、請求項49又は50に記載のピューロマイシン誘導体又はその塩。

52. Xが、 $N\alpha$ -( $N\alpha$ -ベンジルオキシカルボニルフェニルアラニル基である、請求項49から51の何れかに記載のピューロマイシン誘導体又はその塩。

53.  $R^2$ が示す反応性基が、末端にカルボキシル基を有する反応性基である、請求項49から52の何れかに記載のピューロマイシン誘導体又はその塩。

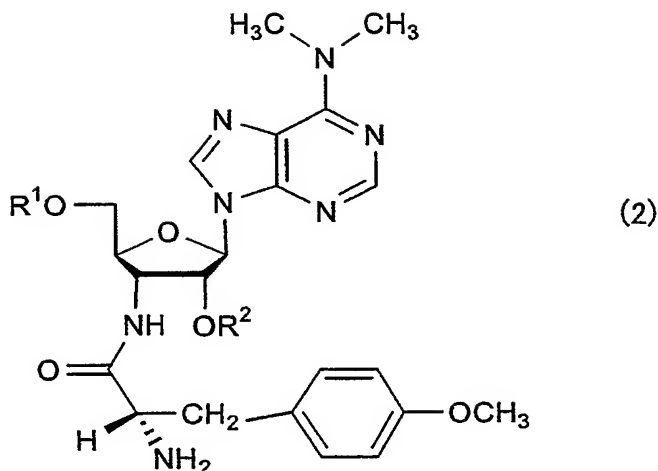
54.  $R^2$ が示す反応性基がスクシニル基である、請求項49から53の何れかに記載のピューロマイシン誘導体又はその塩。

55. 請求項49から54の何れかに記載のピューロマイシン誘導体を支持体に結合してなる、ピューロマイシン誘導体固定化支持体。

56.  $R^2$ が示す反応性基と、支持体中の反応性基とを反応させることにより得られる、請求項55に記載のピューロマイシン誘導体固定化支持体。

57. 支持体が、CPG (Controlled Pore Glass) である、請求項55又は56に記載のピューロマイシン誘導体固定化支持体。

58. 請求項49から54の何れかに記載のピューロマイシン誘導体をペプチダーゼあるいはプロテアーゼで処理することにより、下記式(2)で表される化合物を製造することを含む、ピューロマイシン誘導体の脱保護方法。



(式中、 $R^1$ は水素原子、又は水酸基の保護基を示し； $R^2$ は水素原子又は反応性基を示す。)

59. ペプチダーゼあるいはプロテアーゼがキモトリプシンである、請求項58に記載のピューロマイシン誘導体の脱保護方法。

60. 請求項49から54の何れかに記載のピューロマイシン誘導体又は請求項55から57の何れかに記載のピューロマイシン誘導体固定化支持体を用いた核酸化合物の製造方法。

61. 請求項49から54の何れかに記載のピューロマイシン誘導体を有する核酸化合物。

62. 請求項61に記載の核酸化合物をペプチダーゼあるいはプロテアーゼで処理することによりピューロマイシン誘導体の脱保護を行う、脱保護方法。

63. ペプチダーゼあるいはプロテアーゼがキモトリプシンである、請求項62に記載の脱保護方法。

64. 30から200アミノ酸残基からなる球状タンパク質から成ることを特徴とする、目的ペプチド又は目的タンパク質を融合タンパク質として発現及び提示するための支持体タンパク質。

65. システイン残基を含まない、請求項64に記載の支持体タンパク質。

66. タンパク質の二次構造として $\beta$ シート構造を有さず、 $\alpha$ ヘリックス構

造からなる、請求項 6 4 又は 6 5 に記載の支持体タンパク質。

6 7. タンパク質の立体構造において、N末端とC末端が離れている、請求項 6 4 から 6 6 の何れかに記載の支持体タンパク質。

6 8. 他の生体高分子と相互作用しない、請求項 6 4 から 6 7 の何れかに記載の支持体タンパク質。

6 9. 下記の何れかのアミノ酸配列を有する、目的ペプチド又は目的タンパク質を融合タンパク質として提示するための支持体タンパク質。

(1) 配列番号 2 1 に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列番号 2 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、付加および／または挿入しているアミノ酸配列であって、球状タンパク質を構成するアミノ酸配列：

7 0. 目的ペプチド又は目的タンパク質をコードする塩基配列および請求項 6 4 から 6 9 の何れかに記載の支持体タンパク質をコードする塩基配列が直接またはリンカーを介して連結してなる、目的ペプチド又は目的タンパク質と支持体タンパク質とから成る融合タンパク質をコードする核酸またはその修飾体。

7 1. 目的ペプチド又は目的タンパク質と請求項 6 4 から 6 9 の何れかに記載の支持体タンパク質とから成る融合タンパク質。

7 2. 請求項 7 0 に記載の核酸またはその修飾体を、無細胞翻訳系または生細胞において発現させる工程を含む、請求項 7 1 に記載の融合タンパク質を製造する方法。

7 3. 目的ペプチド又は目的タンパク質をコードする塩基配列および請求項 6 4 から 6 9 の何れかに記載の支持体タンパク質をコードする塩基配列が直接またはリンカーを介して連結してなる目的ペプチド又は目的タンパク質と支持体タンパク質とから成る融合タンパク質をコードする mRNA であって、その 3' 末端に核酸誘導体が結合している mRNA を、無細胞翻訳系または生細胞において発現させる工程を含む、融合タンパク質とそれをコードする核酸とから成る複合体を製造する方法。

74. 核酸誘導体が、ピューロマイシン、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド、3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシドの化学構造骨格を含む化合物又はそれらの類縁体である、請求項73に記載の方法。

75. 融合タンパク質をコードするmRNAとして、3'末端に核酸誘導体がスパーサーを介して結合しているmRNAを使用する、請求項73又は74に記載の方法。

76. スパーサーがポリエチレン又はポリエチレングリコールなどの高分子である、請求項74又は75に記載の方法。

77. (1) 無細胞翻訳系または生細胞において、目的ペプチド又は目的タンパク質を含むライブラリーを、請求項72から76の何れかの方法により、請求項64から69の何れかに記載の支持体タンパク質との融合タンパク質の形態で発現させる工程；及び、

(2) 工程(1)で得られた融合タンパク質をスクリーニングすることにより所望の機能を有する目的ペプチド又は目的タンパク質を選択する工程；を含む、機能性ペプチド又はタンパク質のスクリーニング方法。

78. 互いに相補的な共通配列を有する異なる2種類以上の1本鎖または2本鎖DNAをプライマーの非存在下においてDNA合成酵素を用いて反応させる工程、上記工程で得た混合物を用いてRNAポリメラーゼの存在下で転写反応を行いRNAを合成する工程、およびDNA分解酵素でDNAを分解する工程を含む、請求項1から12、14、15、17、27から30、31、34、37、38、41、44から48の何れかに記載の方法に用いるための一本鎖RNAの製造方法。

79. DNA合成酵素を用いた反応が、Taqポリメラーゼを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である、請求項78に記載の一本鎖RNAの製造方法。

80. 異なる2種類以上の1本鎖または2本鎖DNAのうちの片方のDNAが目的配列を含むDNAである、請求項78または79に記載の一本鎖RNAの製造方法。

81. 異なる2種類以上の1本鎖または2本鎖DNAのうちの片方のDNAが目的配列を含むDNAであり、他方のDNAが支持体タンパク質をコードするDNAである、請求項78から80の何れかに記載の一本鎖RNAの製造方法。

82. 支持体タンパク質が、30から200アミノ酸残基からなる球状タンパク質から成るタンパク質である、請求項81に記載の核酸の一本鎖RNAの製造方法。

83. 請求項78から82の何れかに記載の方法により得られるRNA。

84. (1) 互いに相補的な共通配列を有する異なる2種類以上の1本鎖または2本鎖DNAをプライマーの非存在下においてDNA合成酵素を用いて反応させることにより、連結したDNAと連結しないDNAを含む混合物を調製する工程；

(2) 工程(1)で得た混合物を用いてRNAポリメラーゼの存在下で転写反応を行いRNAを合成する工程；及び

(3) 工程(2)で得たRNAを、無細胞翻訳系または生細胞において発現させる工程を含む、タンパク質の製造方法。

85. (1) 互いに相補的な共通配列を有する異なる2種類以上の1本鎖または2本鎖DNAをプライマーの非存在下においてDNA合成酵素を用いて反応させることにより、連結したDNAと連結しないDNAを含む混合物を調製する工程；

(2) 工程(1)で得た混合物を用いてRNAポリメラーゼの存在下で転写反応を行いRNAを合成する工程；

(3) 工程(2)で得たRNAの3'末端を核酸誘導体で修飾する工程；及び

(4) 工程(3)で得た3'末端を核酸誘導体で修飾したRNAを、無細胞翻訳系または生細胞において発現させる工程を含む、タンパク質とそれをコードする核酸との複合体の製造方法。

86. 核酸誘導体が、ピューロマイシン、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド、3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシドの



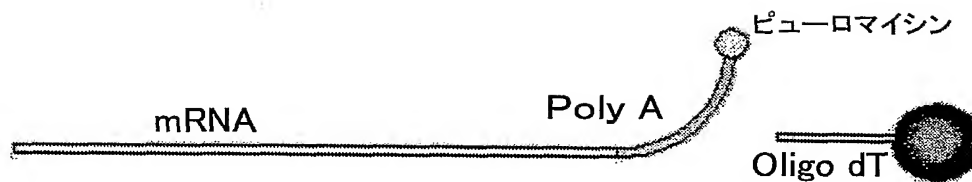
化学構造骨格を含む化合物又はそれらの類縁体である、請求項 85 に記載の方法。

87. mRNA として、3' 末端に核酸誘導体がスペーサーを介して結合している mRNA を使用する、請求項 85 又は 86 に記載の方法。

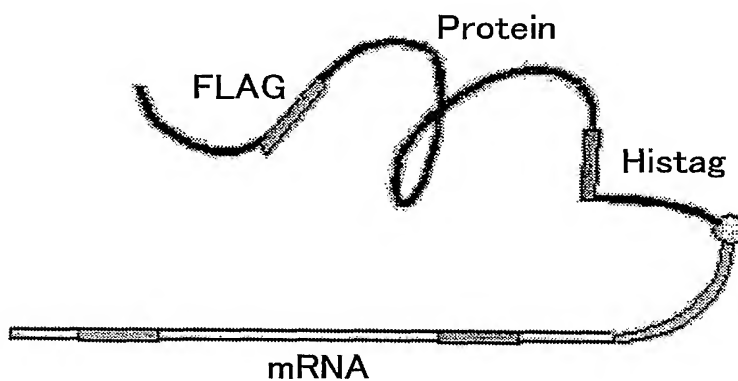
88. スペーサーがポリエチレン又はポリエチレングリコールなどの高分子である、請求項 87 に記載の方法。

図 1

(1)ピュロマイシンスペーサにPoly A



(2)タンパク質にFLAG等の精製用タグを連結



(3)逆転写可能

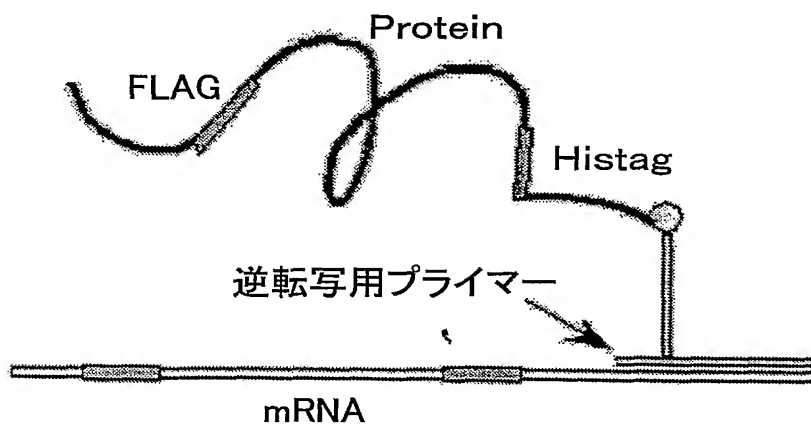


図 2

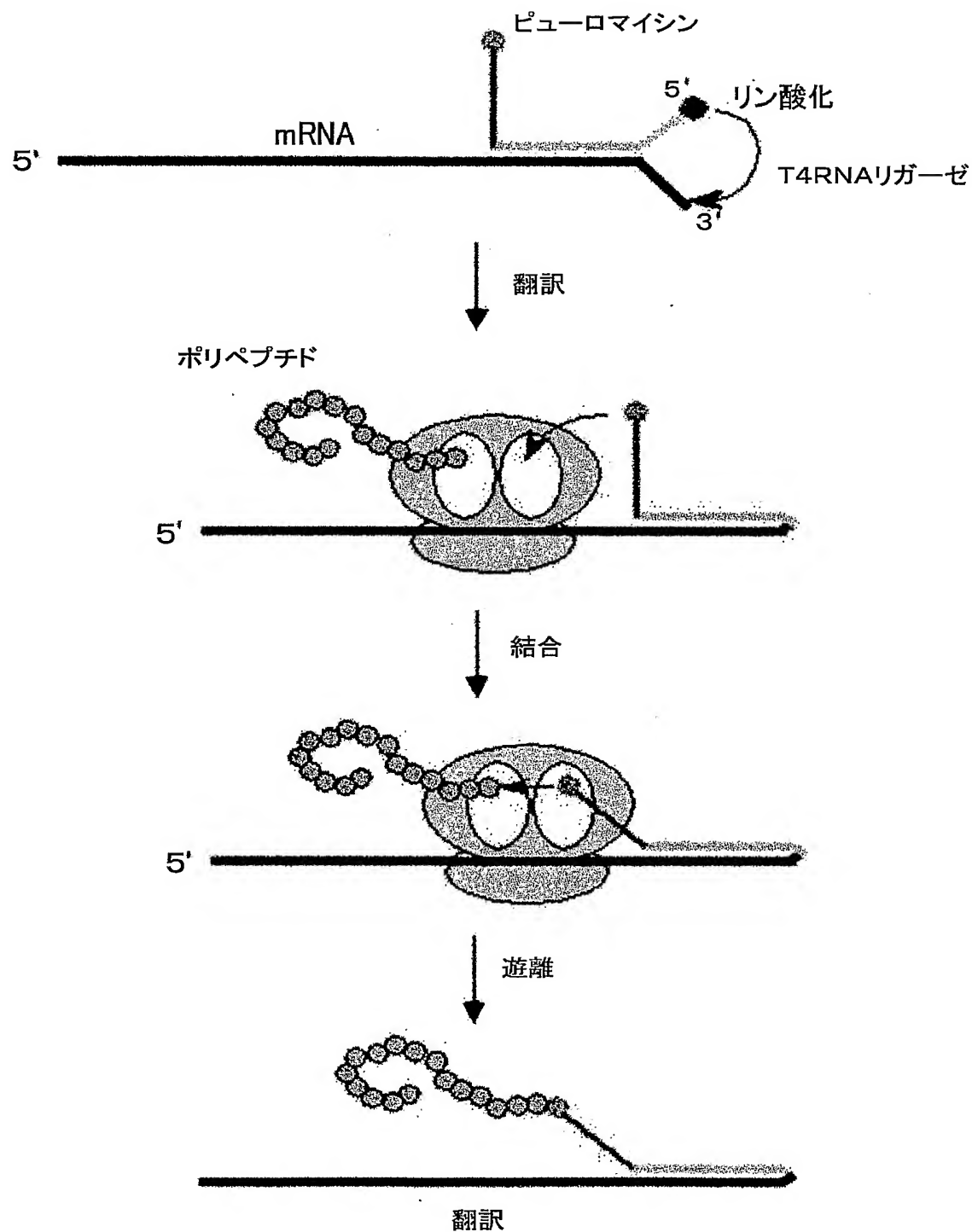


図 3

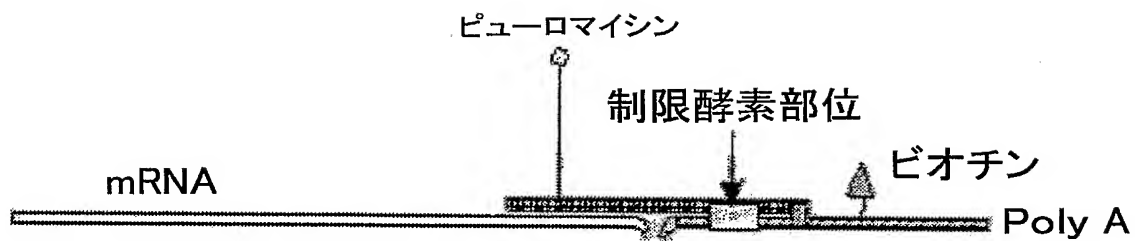
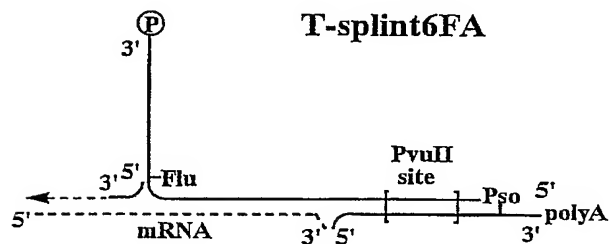
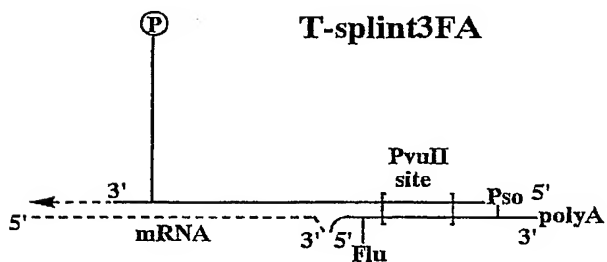
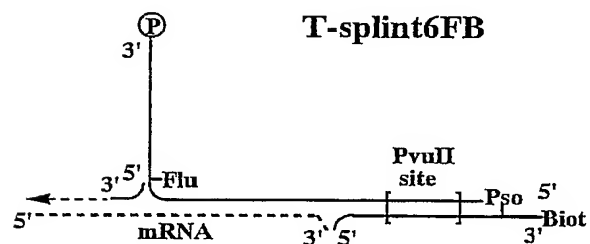
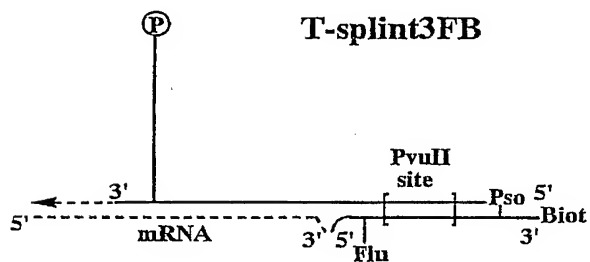
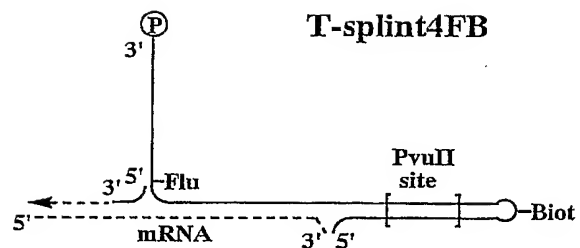
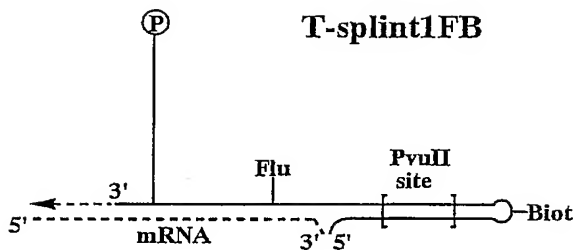


図 4



- Ⓟ ピューロマイシン  
 Flu フルオレセイン  
 Biot ビオチン  
 polyA ポリ-2'-デオキシアデニル酸  
 Pso 光結合ゾラーレン

図 5

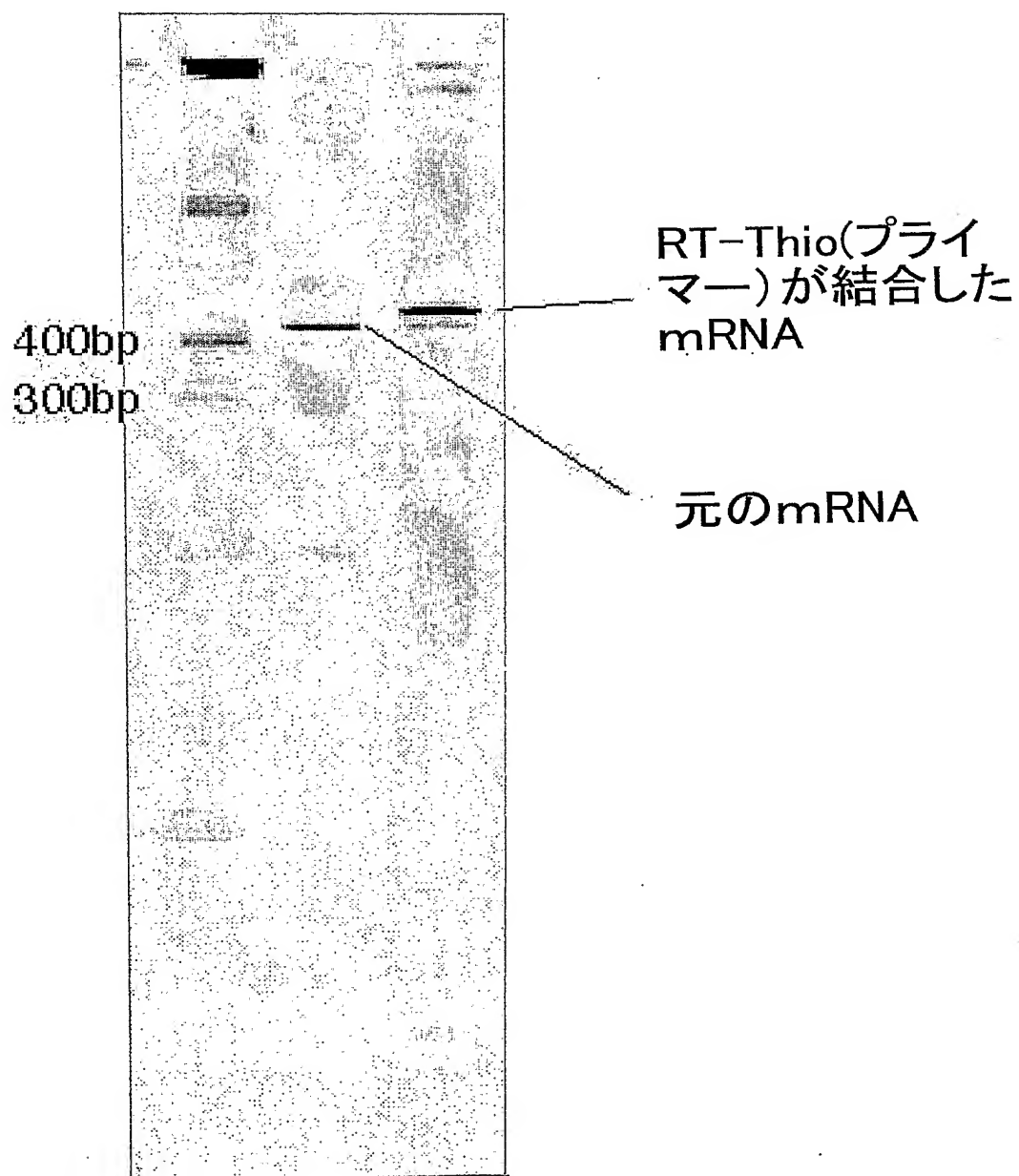


図 6

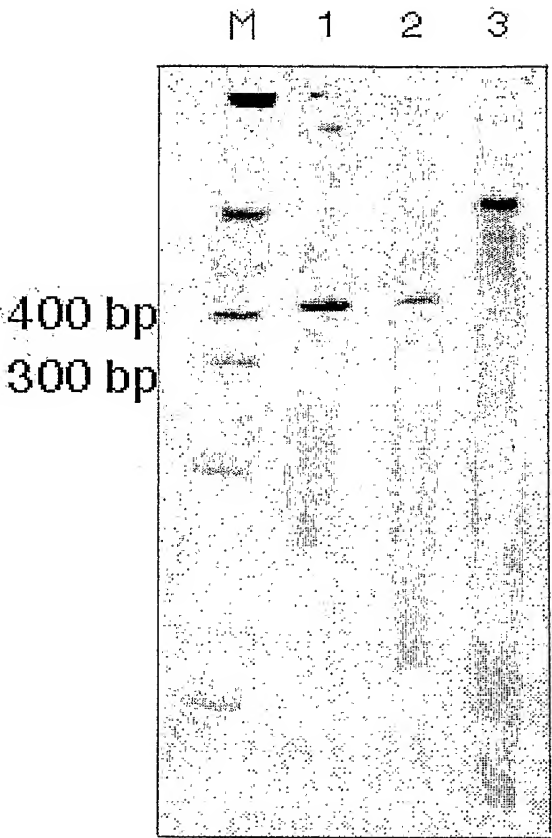


図 7

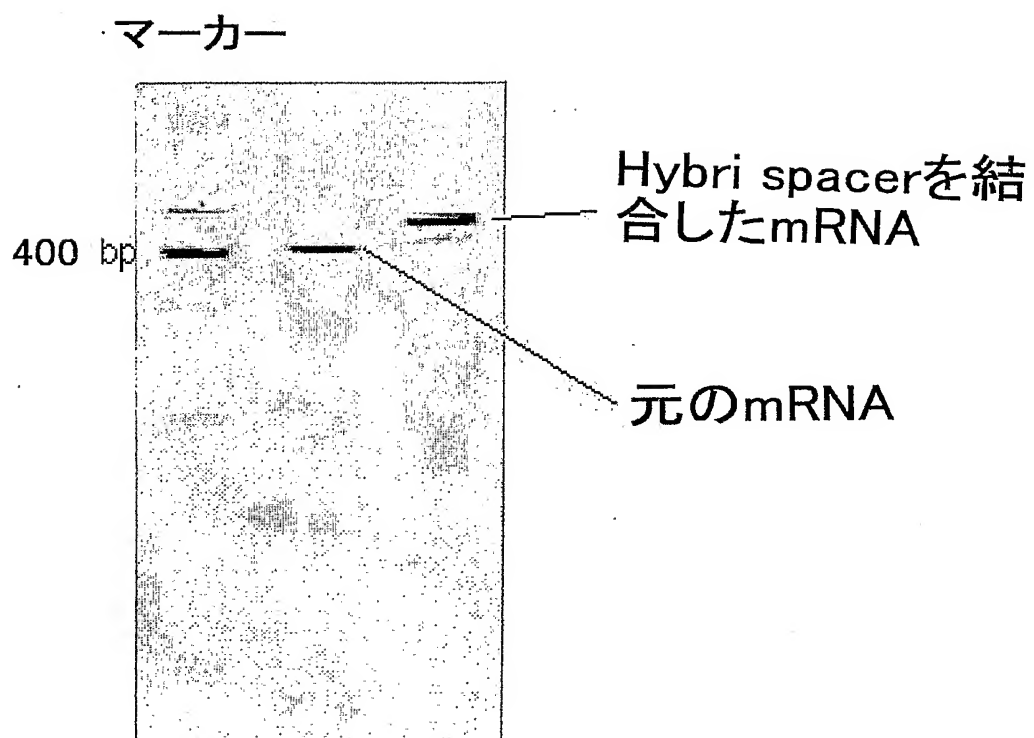




図 8

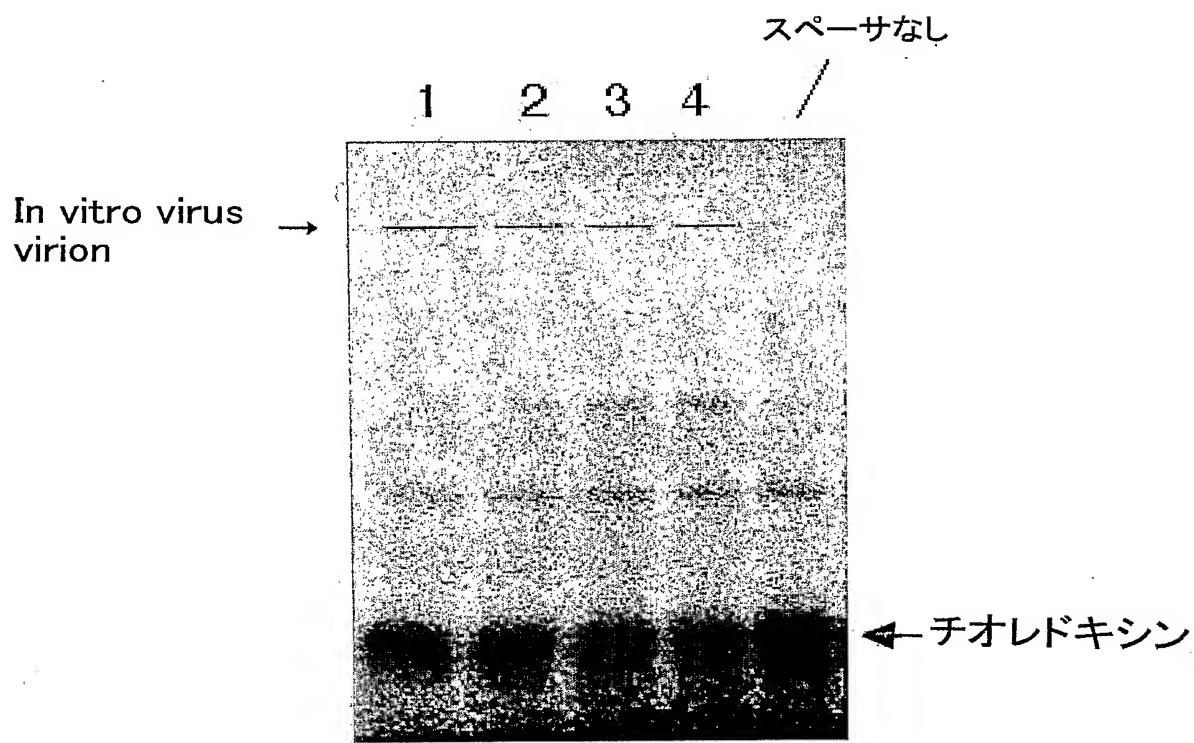


図 9

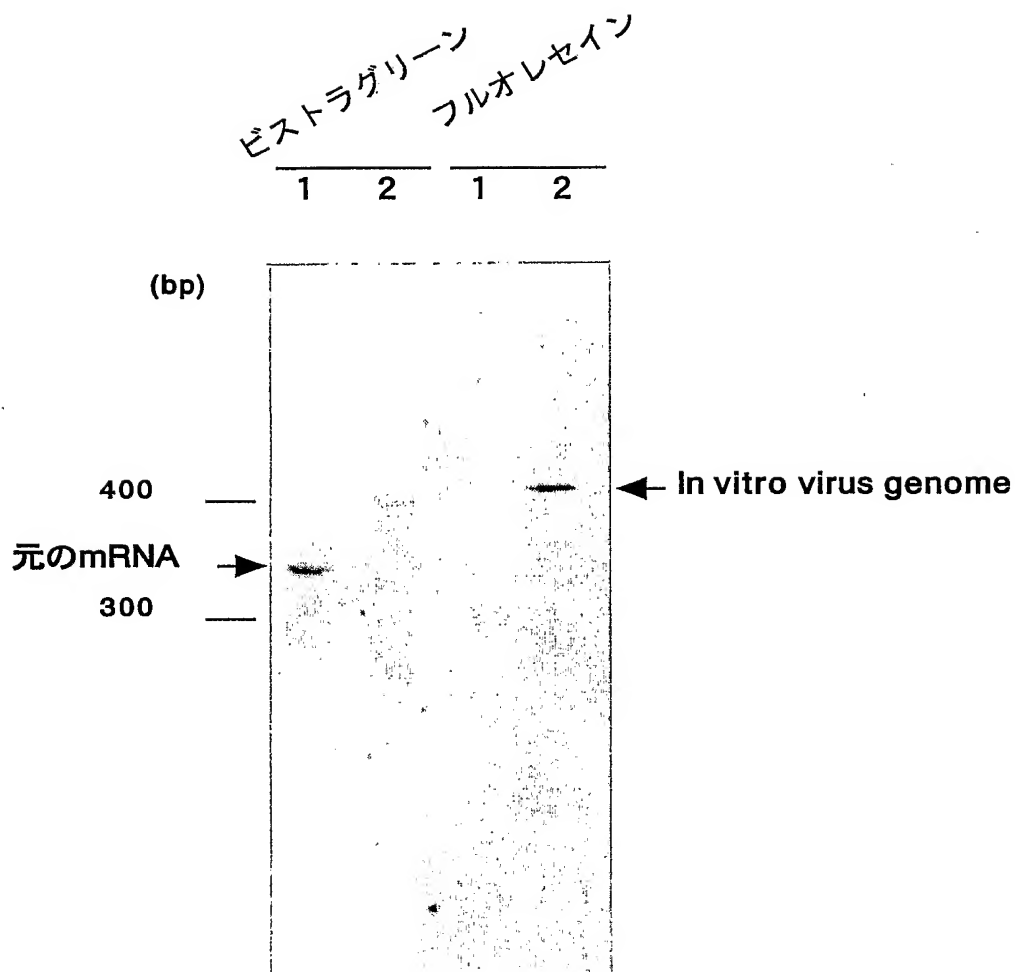


図 10

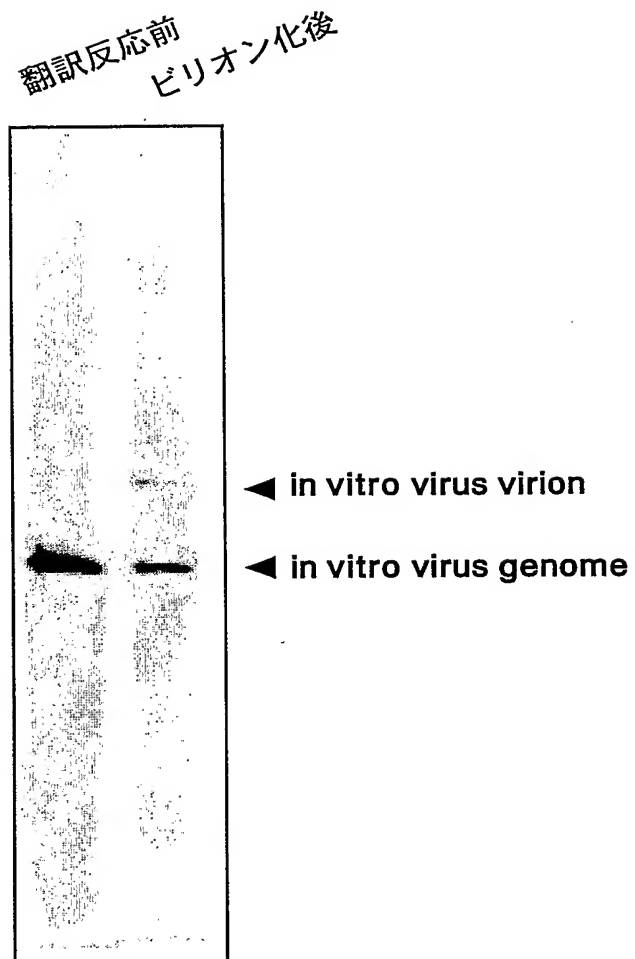


図 11

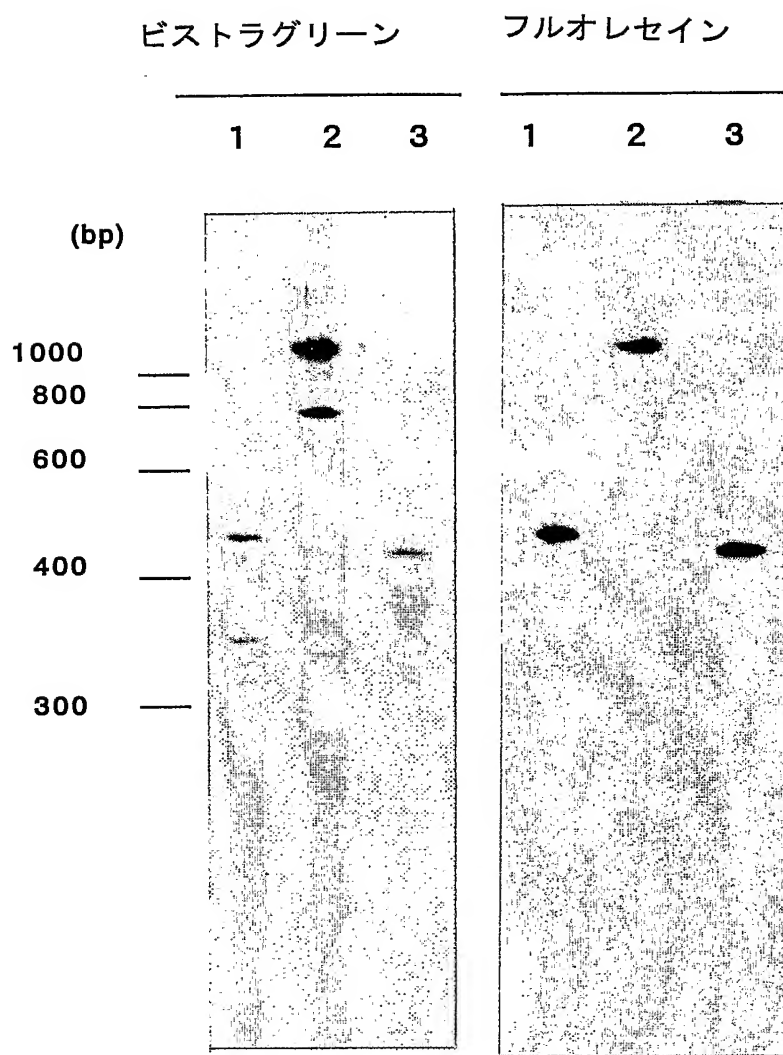


図 12

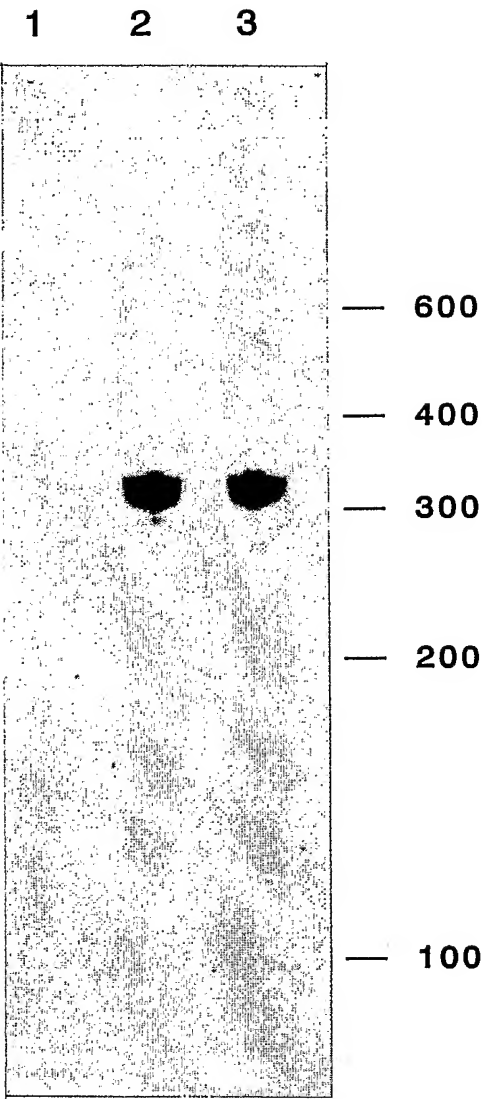


図 13

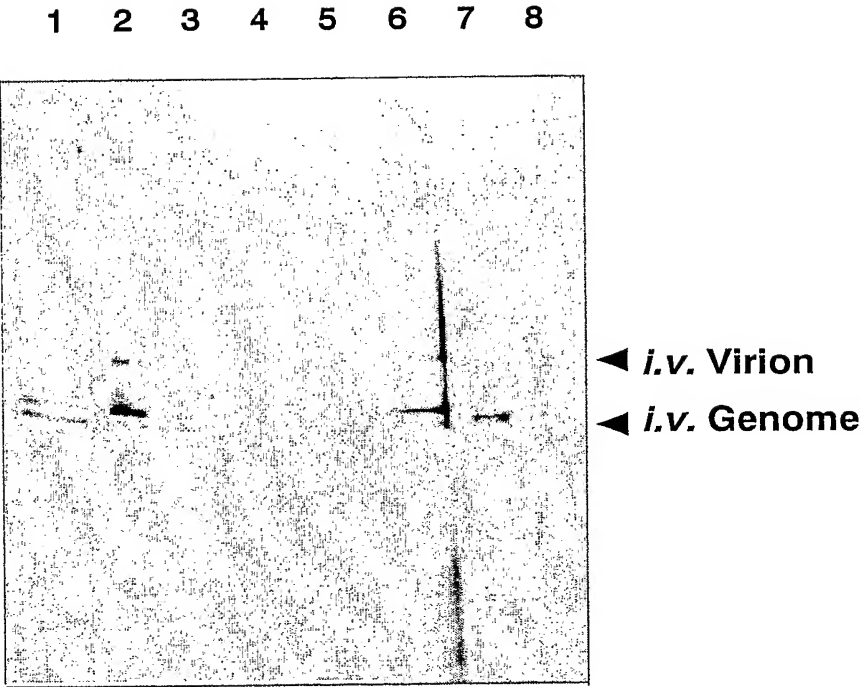


図 14

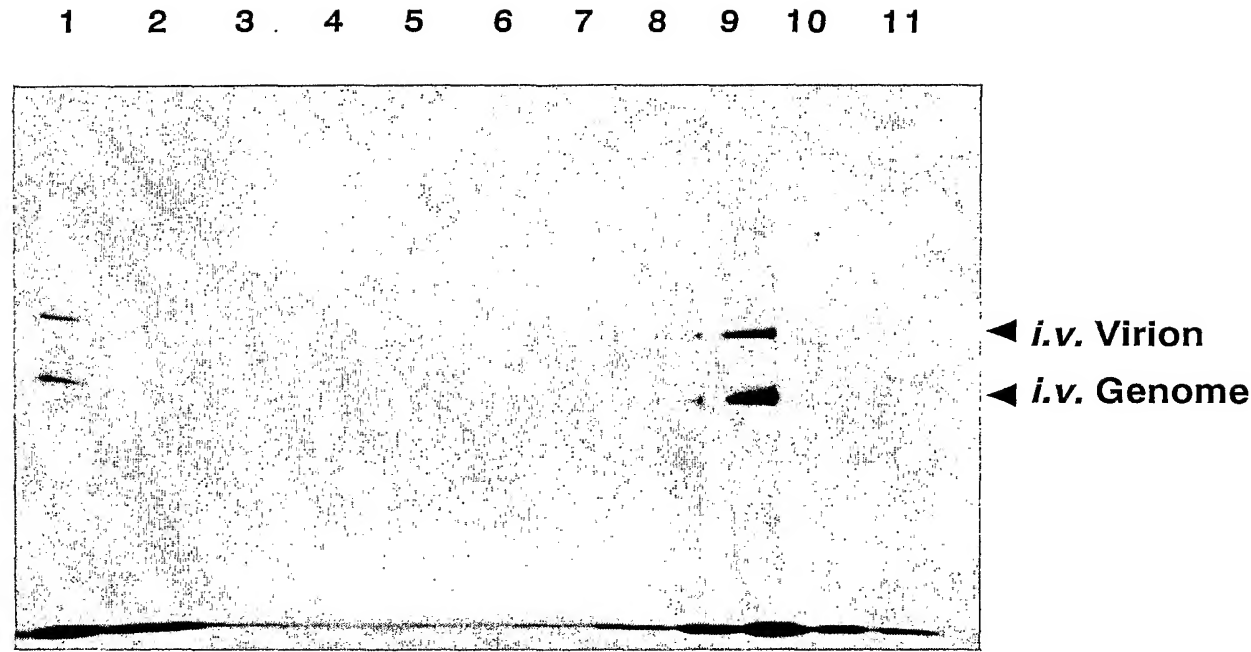


図 15

1回目

Bドメイン : POU

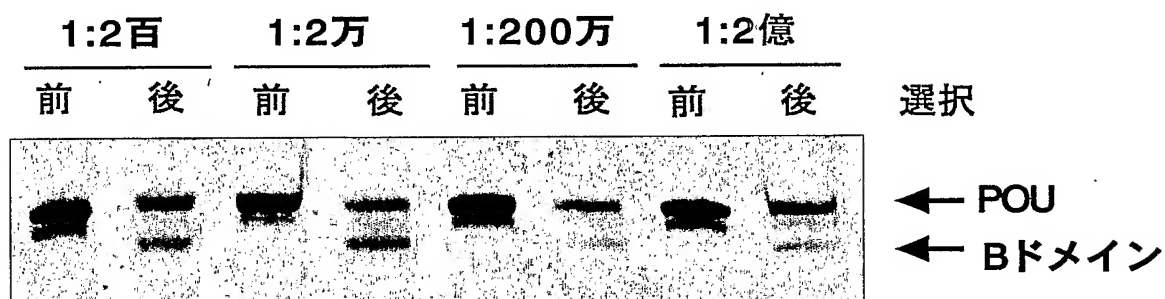
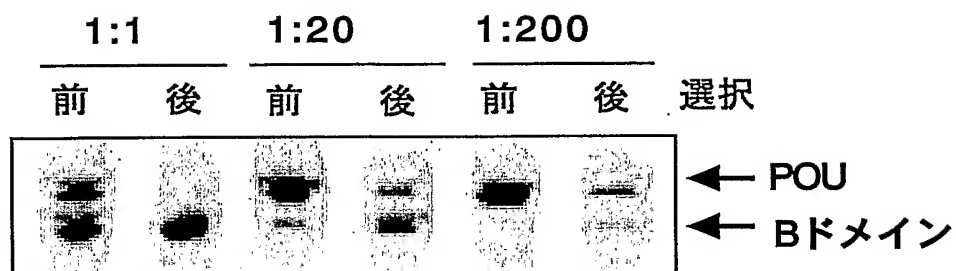




図 16

2 回目

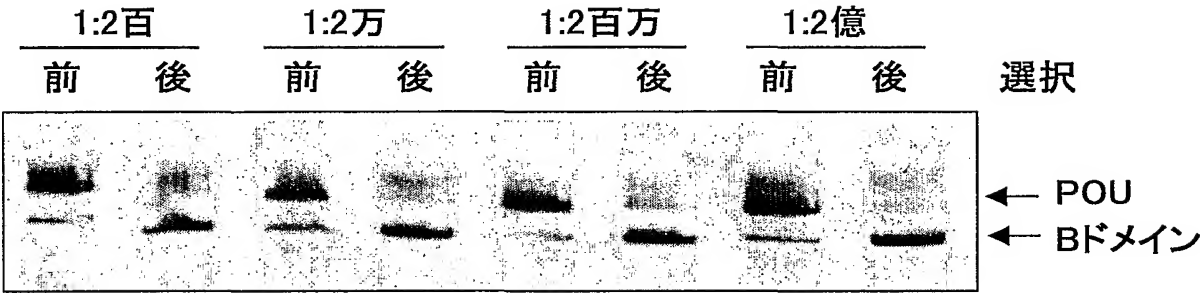


図 17

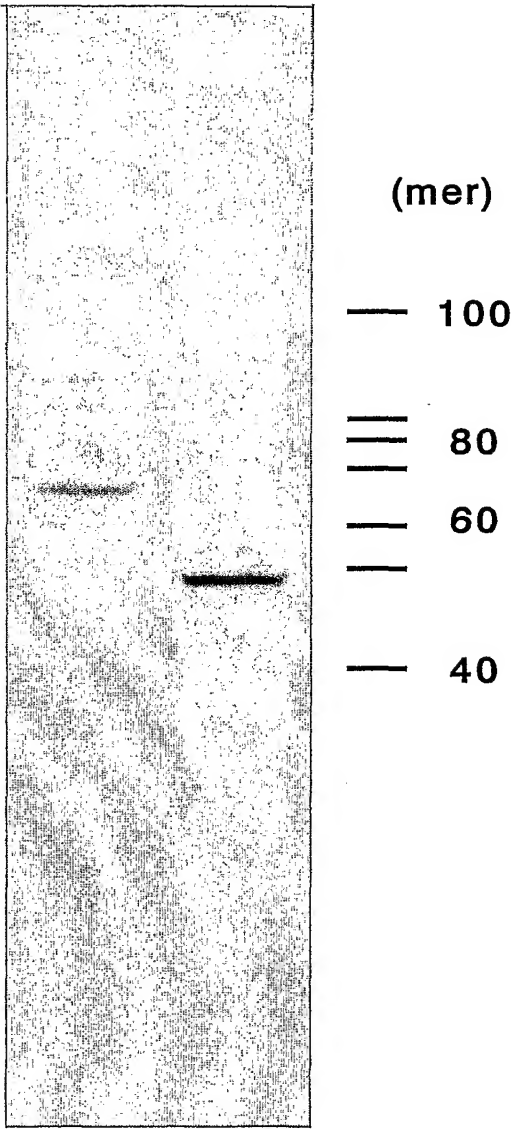


図 18

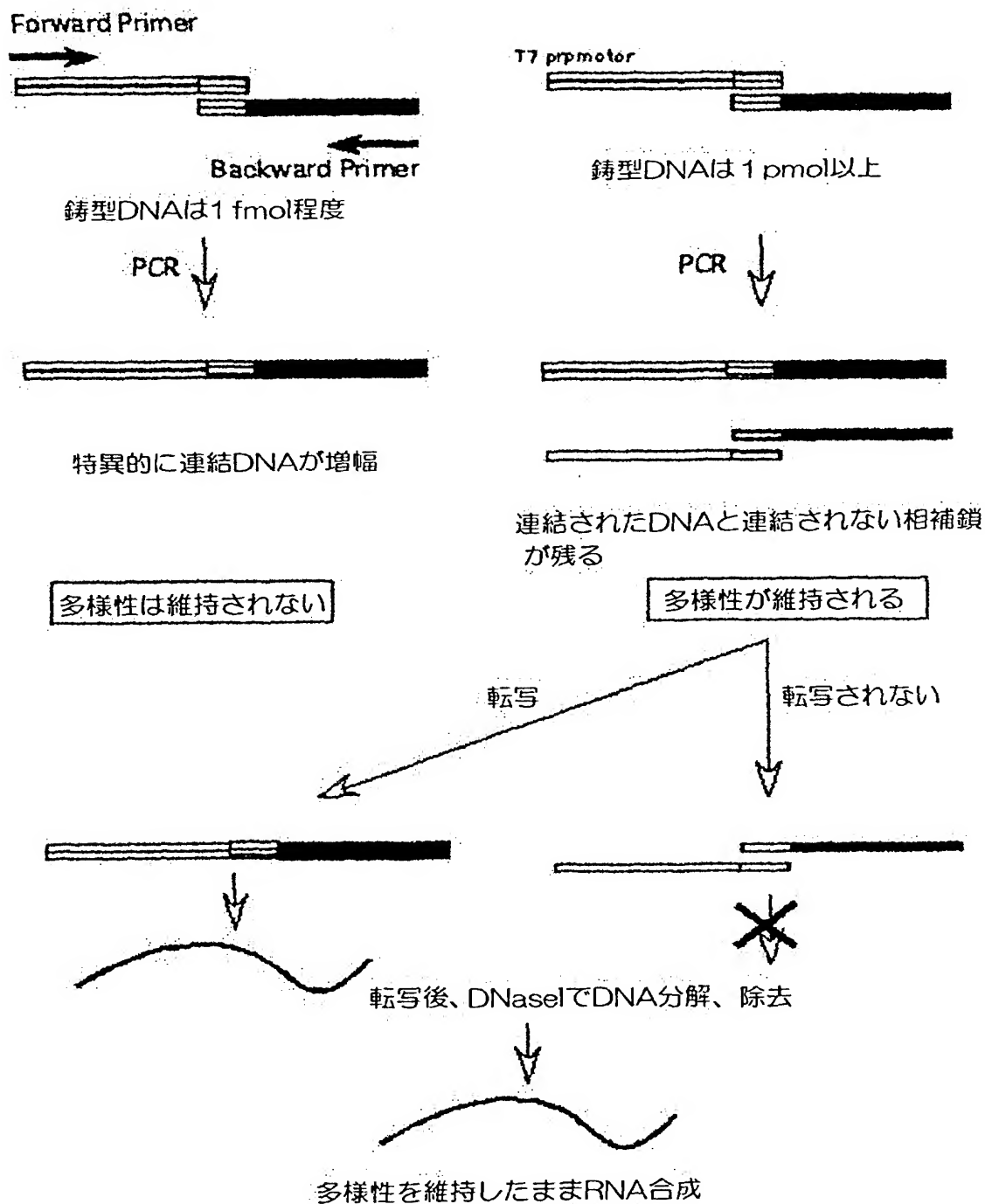


図 19

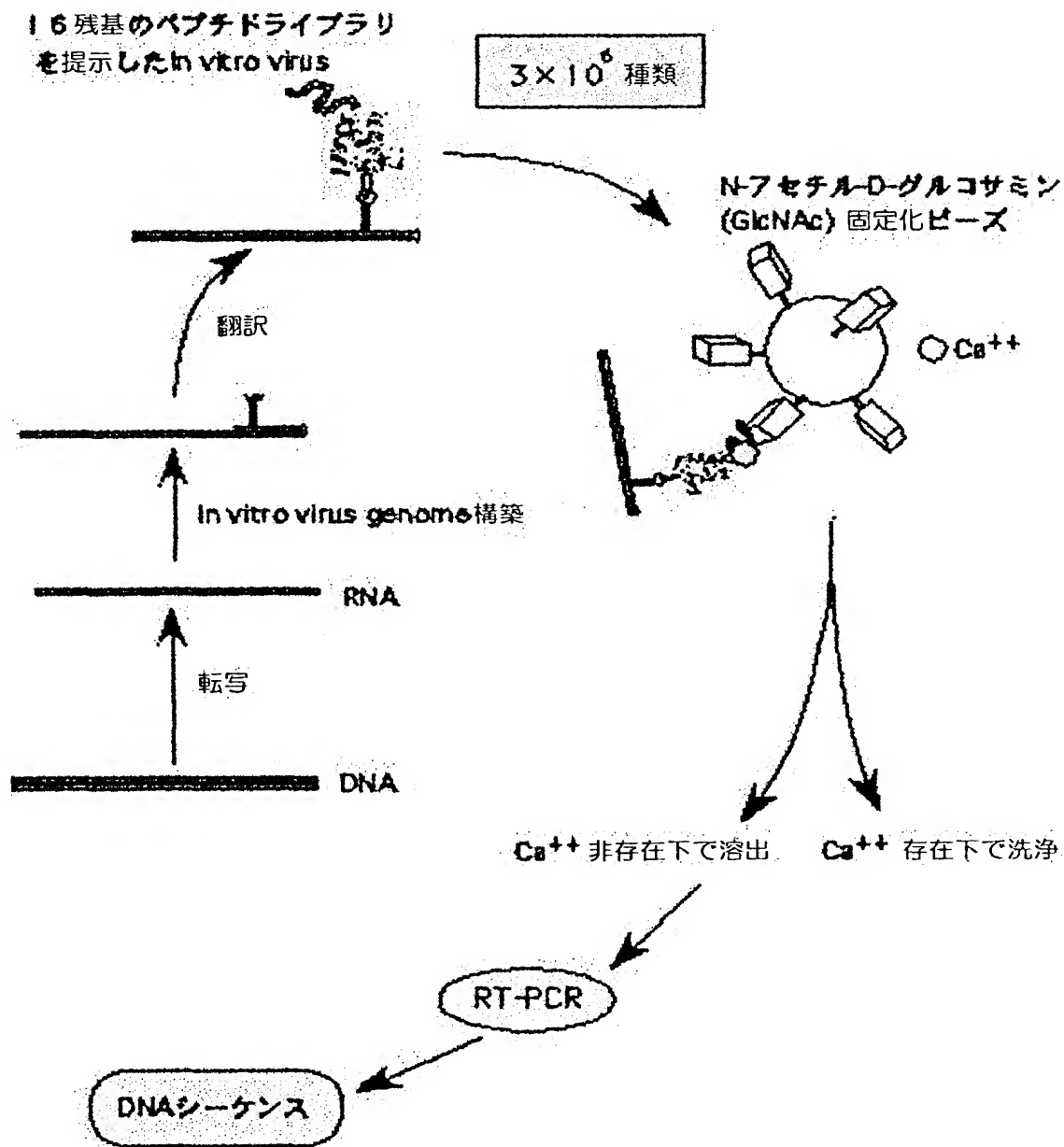


図 20



図 21

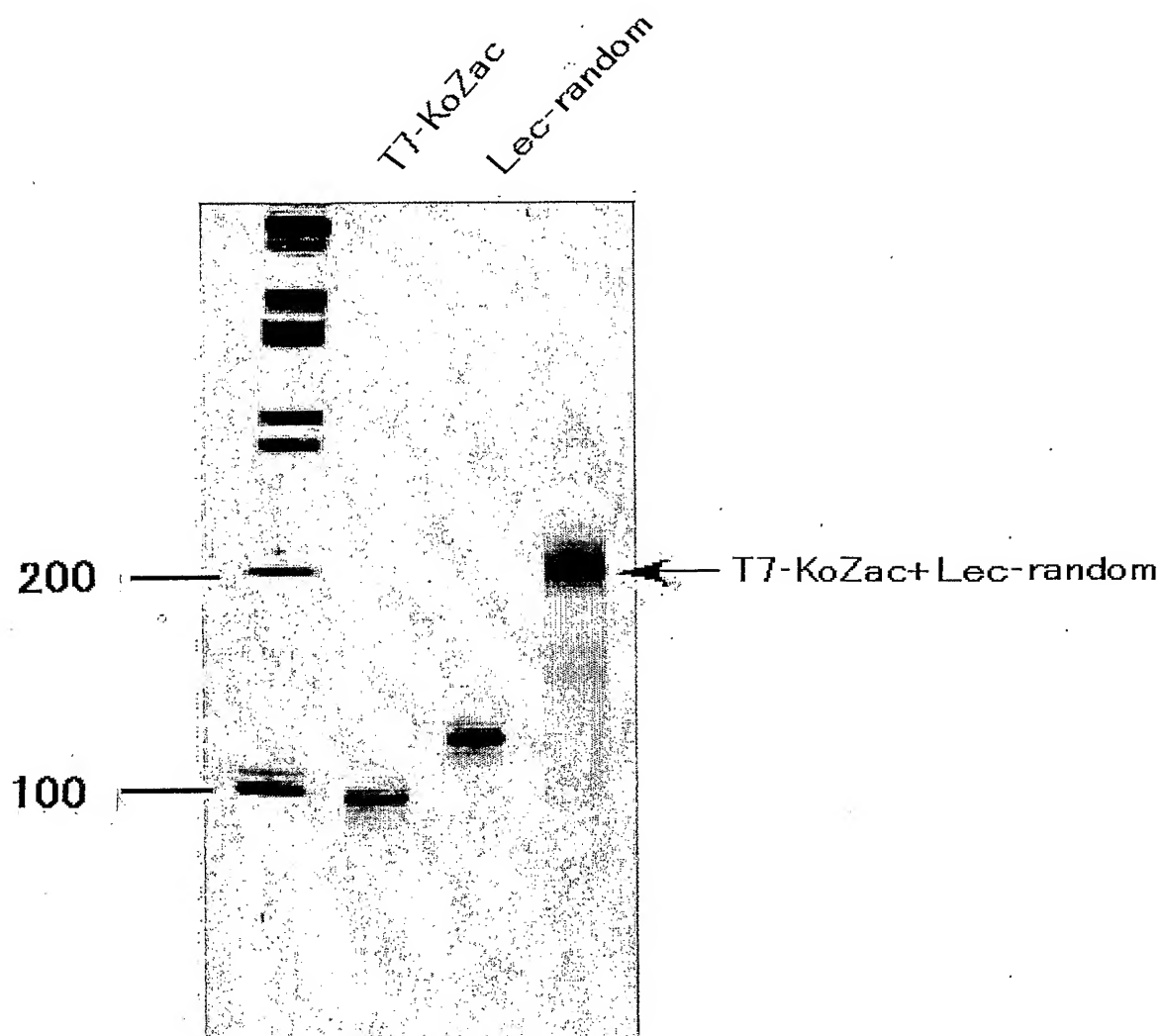


図 23

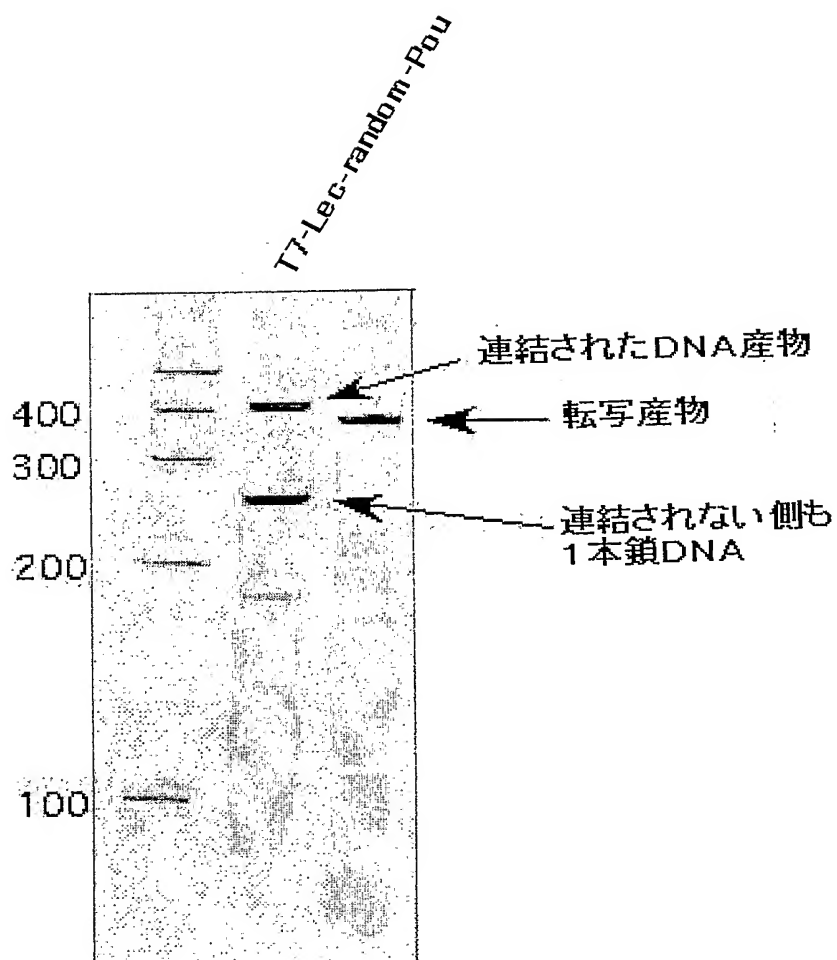


図 24

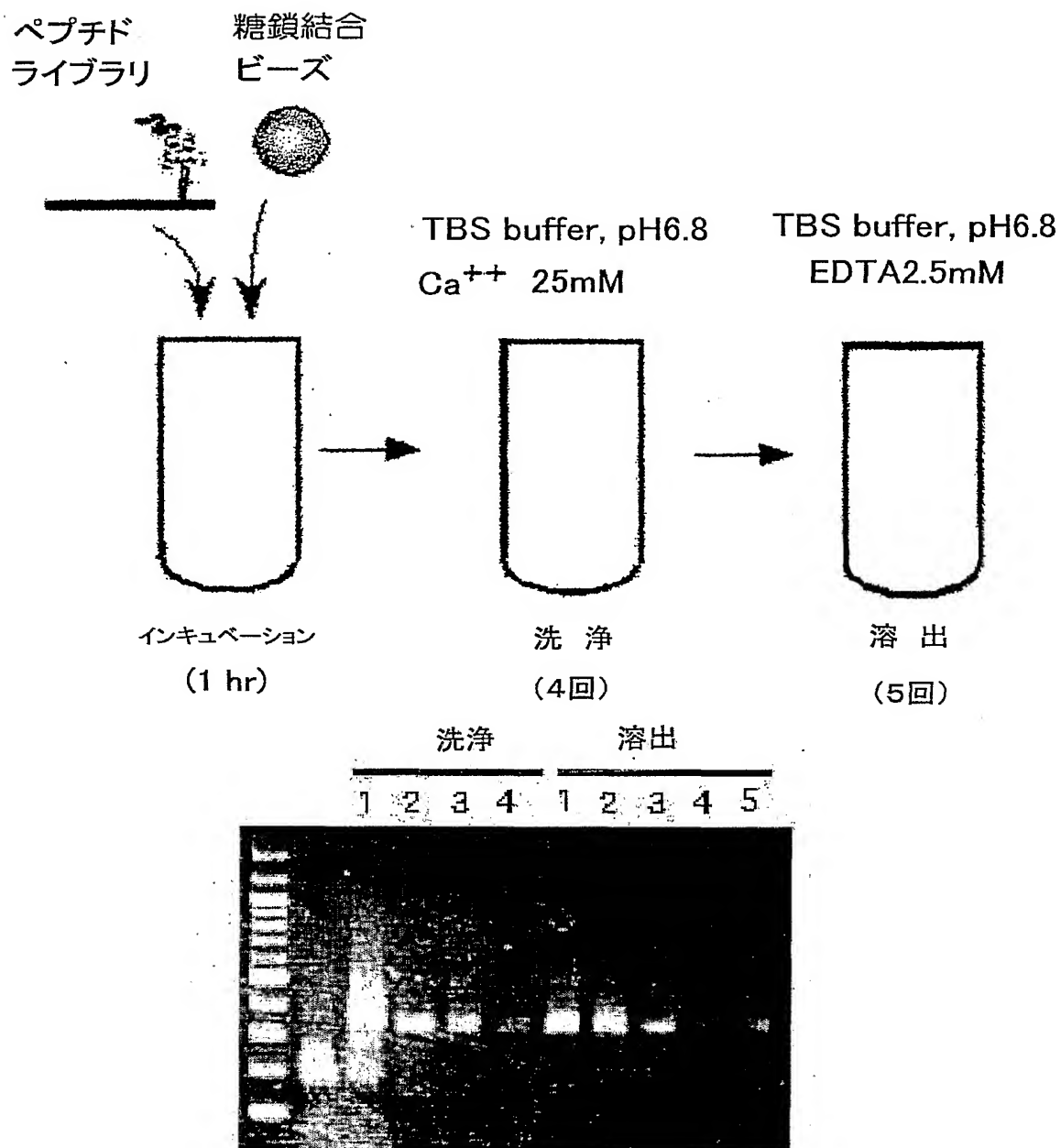




図 25

選択後

(Q)(E)(R)(Q)(S)
(E) I (R)(R)(Q)
(S)(S) L (K)(S)
(E) I (R)(R)(D)
(C) P (R) F (D)
(S) W P (S)(S)
(S) L F (T)(R)

L (S) P (S) P
G L (S) L P
P P (Y) A G

VAVEFDTF(XXXXX)DPSSGGGG

選択前

V (R)(K)(Q) L
L (R)(H)(E) P
(E) V I (R)(Q)

(Q)(S) A I L
(T) V P P (E)
(S) I L I (R)
V P (S)(C) L
W (S)(R) V P
L P (T) L L
L P (T) L L
(Q) V L P L

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Mitsubishi Chemical Corporation

&lt;120&gt; RNA-DNA conjugate and its use

&lt;130&gt; A21793A

&lt;160&gt; 21

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 96

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 1

gatcccgcca aattaatacg actcactata gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat 60

aattttgttt aactttaaga aggagatgcc accatg 96

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 2

gatcccgcca aattaatacg actcactata ggg 33

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

caggtgaata attttatcgc tcatggtggc atctccttc

39

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

gaaggagatg ccaccatgag cgataaaatt attcacctg

39

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

tttcccgcgc ccccccgtc

19

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

ccccgccagg ttagcgtcga ggaactcttt 30

<210> 7

<211> 374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

gatcccgcca aattaatacg actcactata gggagaccac aacggtttcc ctcttgaaat 60

aattttgttt aactttaaga aggagattcc accatggacc ttgaggagct tgagcagttt 120

gccaaagacct tcaaacaag acgaatcaaa cttggattca ctcagggtga tgttgggctc 180

gctatgggga aactatatgg aaatgacttc agccaaacta ccatctctcg atttgaagcc 240

ttgaacctca gctttaagaa catggctaag ttgaagccac ttttagagaa gtggctaaat 300

gatgcagagg ggggaggcag cgattacaag gatgacgatg acaagggcgg aagcggacgg 360

ggggcggcgg gaaa 374

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA .

<400> 8

gtttaacttt aagaaggagt tgccaccatg 30

<210> 9

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

tttcccgcgcg cccccgtcc gttccgccc ttgtcatcgt catccttgta atc 53

<210> 10

<211> 350

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 10

gatcccgcca aattaatacg actcactata gggagaccac aacggtttcc ctcttgaaat 60

aattttgttt aactttaaga aggagttgcc accatggata acaaattcaa caaagaacaa 120

caaaatgctt tctatgaaat cttacattta cctaacttaa acgaagaaca acgcaatggt 180

ttcatccaaa gcctaaaaga tgacccaagc caaagcgcta accttttagc agaagctaaa 240

aagctaaatg atgctcaagc accaaaagct gacaacaaat tcaacggggg aggcagcgat 300

tacaaggatg acgatgacaa gggcggaagc ggacgggggg cggcgggaaa 350

<210> 11

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

```
gctccgagct cattaatacg actcactata gggagaccac aacggtttcc ctcttgaaat 60
aattttgttt aactttaaga aggagttgcc accatg 96
```

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

```
CGGAAACAGC TGCACCCCCC GCCGCCCCCC 30
G(At) (Ft) (Spc) (Spc) (Spc) (Spc) CC(ZFP) 40
```

<210> 13

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

```
gctccgagct cattaatacg actcactata gggagaccac aacggtttcc ctcttgaaat 60
aattttgttt aactttaaga aggagttgcc accatg 96
```

<210> 14

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

gctcaagctc ctcaaggtcg ccaccgcctc cggaagggtc zyxzyxzyxz yxzyxgaagg 60  
tgtcaaattc aacgtcagtc aggtgaataa tttatcgct catggtggca tctccttctt 120

<210> 15

<211> 235

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

gaccttgagg agcttgagca gtttgccaag accttcaaac aaagacgaat caaacttgga 60  
ttcactcagg gtgatgttgg gctcgctatg gggaaactat atggaaatga cttcagccaa 120  
actaccatct ctcgatttga agccttgaac ctcagcttta agaacatggc taagttgaag 180  
ccacttttag agaagtggct aaatgatgca gaggggggag gcagctctag agctg 235

<210> 16

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

ttgagcttga gcgacgacct tgaggagctt gagca 35

<210> 17

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

gaggacgggg ggcggcgggg ggcagctcta gagctgcctc cccc 44

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

ccccccgccg cccccgtcc tc 22

<210> 19

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

gtcctctaga gctgcc 16

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

gatcccgca aattaatacg actcactata ggg 33

<210> 21

<211> 73

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

Met Asp Leu Glu Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys Thr Phe Lys Gln Arg

1 5 10 15

Arg Ile Lys Leu Gly Phe Thr Gln Gly Asp Val Gly Leu Ala Met Gly

20 25 30

Lys Leu Tyr Gly Asn Asp Phe Ser Gln Thr Thr Ile Ser Arg Phe Glu

35 40 45

Ala Leu Asn Leu Ser Phe Lys Asn Met Ala Lys Leu Lys Pro Leu Leu

50

55

60

Glu Lys Trp Leu Asn Asp Ala Glu Gly

65

70

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00544

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/00, C12P21/02, C07H19/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/00, C12P21/02, C07H19/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GenSeq, BIOSIS, WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NISHIGAKI et al., Y-ligation: An efficient method for ligating single-stranded DNAs and RNAs with T4 RNA ligase. Molecular Diversity, Vol.4, No.3, pages 187 to 190 (1998), particularly, page 190, left column, lines 20 to 24	1-18, 44-48
A	NEMOTO et al., In vitro virus: Bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. FEBS Letters, Vol.414, pages 405 to 408 (1997)	19-43
A	Morris J. Robins et al., "Syntheses of Puromycin from Adenosine and 7-Deazapuromycin from Tubercidin, and Biological Comparisons of the 7-Aza/Deaza Pair. J.Org.Chem., Vol.66, No.24, pages 8204 to 8210 (2001)	49-63

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
10 April, 2003 (10.04.03)

Date of mailing of the international search report  
22 April, 2003 (22.04.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00544

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Robert Vince et al., Carbocyclic Puromycin: Synthesis and Inhibition of Protein Biosynthesis. J.Med.Chem., Vol.29, No.11, pages 2400 to 2403 (1986)	49-63
A	Heejoo Lee et al., Puromycin Analogues. Effect of Aryl-Substituted Puromycin Analogues on the Ribosomal Peptidyltransferase Reaction. J.Med.Chem., Vol.24, No.3, pages 304 to 308 (1981)	49-63
A	JP 11-071392 A (President of Tokyo Medical and Dental University), 16 March, 1999 (16.03.99), (Family: none)	49-63
X	J.D. Klemm et al., Crystal Structure of the Oct-1 POU Domain Bound to an Octamer Site: DNA Recognition with Tethered DNA-Binding Modules. Cell, Vol.77, pages 21 to 32 (1994), particularly, page 30, first line of "Protein and DNA Purification"	64-77
X	N.Assa-munt et al., The Solution Structure of the Oct-1 POU-Specific Domain Reveals a Striking Similarity to the Bacteriophage $\lambda$ Repressor DNA-Binding Domain. Cell, Vol.73, pages 193 to 205 (1993)	64-77
X	WO 00/00632 A (PHYLOS INC.), 06 January, 2000 (06.01.00), & JP 2002-519038 A	78-88
P,X	JP 2002-291491 A (Gen Com Co.), 08 October, 2002 (08.10.02), (Family: none)	1-4, 6-18
E,X	JP 2003-070482 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 11 March, 2003 (11.03.03), (Family: none)	64-77
A	R.W. Roberts et al., RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. Proc. Natl.Acad.Sci.USA, Vol.94, pages 12297 to 12302 (1997)	1-63
P,A	JP 2002-265492 A (Gen Com Co.), 18 September, 2002 (18.09.02), (Family: none)	49-63

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00544

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The special technical feature of claims 1 to 18 resides in a method of producing an RNA-DNA ligation product involving the step of treating an annealing product of a single-stranded RNA and a single-stranded DNA with an RNA ligase. The special technical feature of claims 19 to 43 resides in a nucleic acid construct having a primer sequence for reverse-transcription of a single-stranded RNA at the 3'-end and containing a single-stranded DNA sequence to which a spacer having a nucleic acid derivative at an end is bonded thereto in a branched state. The special technical feature of claims 46 to 48 resides in the steps (1) and (2) as set forth in these claims. The special technical feature of claims 49 to 63 resides in a puromycin derivative represented by the formula (1). The special technical feature of claims 64 to 68 resides in a carrier protein as set forth in claim 64. The special technical feature of claim 69 resides in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:21. The special technical feature of claims 78 to 83 resides in a method of producing a single-stranded RNA involving the step as set forth in claim 78. The special technical feature of claims 84 to 88 resides in a method involving the steps (1) and (2) as set forth in these claims.

As discussed above, it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. Such being the case, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Claims 1 to 88 can be classified into at least 8 groups of inventions as shown below. Claims given in the parentheses each falls within some group of inventions based on the claim on which it depends.

Claims 1 to 18 (44 to 45)  
Claims 19 to 43 (44 to 45)  
Claims 46 to 48  
Claims 49 to 63  
Claims 64 to 68 (70 to 77)  
Claims 69 (70 to 77)  
Claims 78 to 83  
Claims 84 to 88

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/09, C07K 14/00, C12P 21/02, C07H 19/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/09, C07K 14/00, C12P 21/02, C07H 19/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
SwissProt/PIR/GenSeq, BIOSIS, WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Nishigaki et al, Y-ligation: An efficient method for ligating single-stranded DNAs and RNAs with T4 RNA ligase. Molecular Diversity, Vol. 4, No. 3, P. 187-190 (1998) 特に P. 190 左欄第 20-24 行参照	1-18, 44-48
A	Nemoto et al, In vitro virus: Bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. FEBS Letters, Vol. 414, P. 405-408 (1997)	19-43

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 10.04.03

国際調査報告の発送日 22.04.03

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
新見 浩一

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B 9162

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別頁参照)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Morris J. Robins et al, Syntheses of Puromycin from Adenosine and 7-Deazapuromycin from Tubercidin, and Biological Comparisons of the 7-Aza/Deaza Pair. J. Org. Chem., Vol. 66, No. 24, P. 8204-8210 (2001)	49-63
A	Robert Vince et al, Carbocyclic Puromycin: Synthesis and Inhibition of Protein Biosynthesis. J. Med. Chem., Vol. 29, No. 11, P. 2400-2403 (1986)	49-63
A	Heejoo Lee et al, Puromycin Analogues. Effect of Aryl-Substituted Puromycin Analogues on the Ribosomal Peptidyltransferase Reaction. J. Med. Chem., Vol. 24, No. 3, P. 304-308 (1981)	49-63
A	JP 11-071392 A (東京医科歯科大学長) 1999. 03. 16 (ファミリーなし)	49-63
X	J. D. Klemm et al, Crystal Structure of the Oct-1 POU Domain Bound to an Octamer Site: DNA Recognition with Tethered DNA-Binding Modules. Cell, Vol. 77, P. 21-32 (1994) 特に P. 30 「Protein and DNA Purification」の第一文参照	64-77
X	N. Assa-munt et al, The Solution Structure of the Oct-1 POU-Specific Domain Reveals a Striking Similarity to the Bacteriophage λ Repressor DNA-Binding Domain. Cell, Vol. 73, P. 193-205 (1993)	64-77
X	WO 00/00632 A (PHYLOS INC.) 2000. 01. 06 & JP 2002-519038 A	78-88
P、X	JP 2002-291491 A (株式会社ジェンコム) 2002. 10. 08 (ファミリーなし)	1-4, 6-18
E、X	JP 2003-070482 A (三菱化学株式会社) 2003. 03. 11 (ファミリーなし)	64-77
A	R. W. Roberts et al, RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94, P. 12297-12302 (1997)	1-63
P、A	JP 2002-265492 A (株式会社ジェンコム) 2002. 09. 18 (ファミリーなし)	49-63

## 第II欄

請求の範囲1-18の特別な技術的特徴は、一本鎖RNAと一本鎖DNAとのアニーリング産物をRNAリガーゼで処理する工程を含むRNA-DNA結合体の製造方法であり、請求の範囲19-43の特別な技術的特徴は、3'末端に一本鎖RNAの逆転写のためのプライマー配列を有し、かつ核酸誘導体を末端に有するスペーサーが枝分かれした状態で結合している一本鎖DNA配列を含む核酸構築物であり、請求の範囲46-48の特別な技術的特徴は、同項における(1)

(2)の工程であり、請求の範囲49-63の特別な技術的特徴は、式(1)で表されるピュロマイシン誘導体であり、請求の範囲64-68の特別な技術的特徴は、請求の範囲64に記載された支持体タンパク質であり、請求の範囲69の特別な技術的特徴は、配列番号21に記載のアミノ酸配列であり、請求の範囲78-83の特別な技術的特徴は、請求の範囲78に記載の工程を含む一本鎖RNAの製造方法であり、請求の範囲84-88の特別な技術的特徴は、同項における(1)(2)の工程を含む方法である。

このように、各発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

請求の範囲1-88は、少なくとも次の8個の発明群に分けることができる。なお、括弧内の請求の範囲は、それが引用する請求の範囲によって、いずれかの発明群に含まれる。

- ・請求の範囲1-18 (44-45)
- ・請求の範囲19-43 (44-45)
- ・請求の範囲46-48
- ・請求の範囲49-63
- ・請求の範囲64-68 (70-77)
- ・請求の範囲69 (70-77)
- ・請求の範囲78-83
- ・請求の範囲84-88